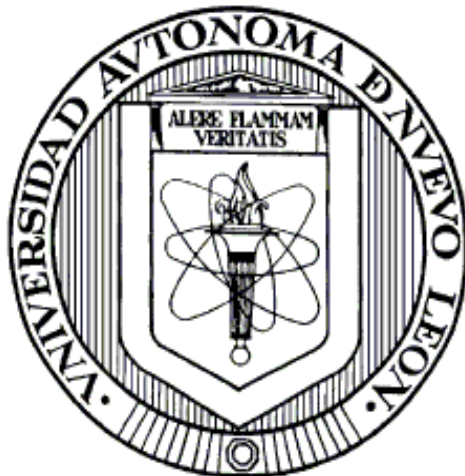


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NUEVOS  
DERIVADOS DE AZETIDIN-2-ONA CONJUGADOS CON UN ANTICUERPO  
MONOCLONAL ANTI-HER-2.

**POR**

**M.C. FABIÁN ELISEO OLAZARÁN SANTIBÁÑEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

**DICIEMBRE, 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS**

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NUEVOS  
DERIVADOS DE AZETIDIN-2-ONA CONJUGADOS CON UN ANTICUERPO  
MONOCLONAL ANTI-HER-2.**

**PRESENTADO POR**

M.C. Fabián Eliseo Olazarán Santibáñez

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Isaías Balderas Rentería

**LUGAR DE REALIZACIÓN**

División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas,  
Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica,  
Av. Guerrero y Progreso s/n, Colonia Treviño, Monterrey, Nuevo León

**Diciembre, 2016**

“SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NUEVOS  
DERIVADOS DE AZETIDIN-2-ONA CONJUGADOS CON UN ANTICUERPO  
MONOCLONAL Anti-HER-2”

**Revisión de la tesis**

---

Dr. Isaías Balderas Rentería

---

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera

---

Dra. Lucia Guadalupe Cantú Cárdenas

---

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

---

Dr. Gildardo Rivera Sanchez

---

Dr. Debasish Bandyopadhyay

---

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez  
**Subdirectora de Estudios de Posgrado**

“SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NUEVOS  
DERIVADOS DE AZETIDIN-2-ONA CONJUGADOS CON UN ANTICUERPO  
MONOCLONAL Anti-HER-2”

Aprobación de la tesis

---

Dr. Isaías Balderas Rentería

**Presidente**

---

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera

**Secretario**

---

Dra. Lucia Guadalupe Cantú Cárdenas

**Vocal 1**

---

Dr. José Ezequiel Viveros Valdez

**Vocal 2**

---

Dra. María del Pilar Carranza Rosales

**Vocal 3**

---

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

**Subdirectora de Estudios de Posgrado**

---

**RESUMEN****Universidad Autónoma de Nuevo León    Fecha de Graduación:** Diciembre 2016**Facultad de Ciencias Químicas****Título del proyecto:**Síntesis y evaluación biológica *in vitro* e *in vivo* de nuevos derivados de azetidin-2-ona conjugados con un anticuerpo monoclonal anti-Her-2.**Número de página:** 123

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con orientación en Farmacia

**Área de estudio:** Investigación Farmacéutica

**Propósito y Método de Estudio:** Actualmente las terapias anticancerígenas biodirigidas, continúan siendo un reto importante para la comunidad científica. El desarrollo de nuevos fármacos a partir de anticuerpos monoclonales parece ser una alternativa confiable y segura. En el presente proyecto se realizó el diseño, síntesis y evaluación biológica *in vitro* e *in vivo* de nuevos derivados de azetidin-2-ona, uno de los cuales fue conjugado con un anticuerpo monoclonal (Trastuzumab) con potencial actividad antineoplásica. Se presentan los resultados de la ruta de síntesis establecida para la obtención de los derivados de 3-amino-azetidin-2-ona, además de un análisis de acoplamiento molecular sobre los sitios de unión a la  $\beta$ -tubulina. Realizando una selección del compuesto más activo frente a las líneas celulares SiHa, B16F10, K562 y Chang, se eligió al compuesto F-12-3t por su actividad antineoplásica e inductor de apoptosis, dicho compuesto fue conjugado con el anticuerpo monoclonal Trastuzumab y su actividad anticancerígena *in vitro* e *in vivo* fue también evaluada.

**Contribuciones y Conclusiones.** Se sintetizaron diecinueve derivados de 3-amino-azetidin-2ona, en configuraciones *cis* y *trans*, observando de acuerdo al análisis de química computacional que presentan una afinidad sobre el sitio de unión de la colchicina en seis aminoácidos que son Cys 239, Lys 252, Val 316, Lys 350, Leu

246 y Ala 248, y una actividad anticancerígena en ensayos *in vitro* en células SiHa de 1.39  $\mu\text{M}$  para el compuesto F-12-3t. Ésta misma molécula conjugada con el anticuerpo anti-Her2 Trastuzumab, presentó una actividad anticancerígena *in vitro* de 0.105  $\mu\text{g/mL}$ , que es menor a la del anticuerpo solo (0.3642  $\mu\text{g/mL}$ ). mientras que administrada en ratones a los que se les indujo el desarrollo de tumores de melanoma, la supervivencia aumentó en un 71.4% en comparación con los ratones sin tratamiento y un 57.8% en comparación con los ratones a los que se les proporcionó un tratamiento con la molécula separada. Este tipo de moléculas podrían ser candidatos idóneos para el desarrollo de fármacos anticancerígenos al unirse específicamente al receptor Her-2 y consecuentemente impedir la proliferación celular cancerígena.

Firma del asesor:

\_\_\_\_\_  
Dr. Isaías Balderas Rentería

---

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por darme la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos y sobre todo el mejorar como profesionista.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por su confianza, y brindarme su soporte para desarrollarme en el ámbito profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por gran apoyo económico a través de la beca nacional de posgrado y el complemento de beca para la estancia internacional en EUA.

Al Dr. José Alberto Ramírez de León Director de Programas de Apoyo del estado de Tamaulipas por su apoyo al proporcionar una beca adicional para continuar desarrollándome científica y profesionalmente.

Al Dr. Isaías Balderas Rentería por su confianza y enseñanzas a través de este campo científico.

Al comité tutorial de Doctores; Dra. Lucia Cantú , Dr. Abraham García, Dra. Mónica Ramírez por su apoyo incondicional y sus sabios consejos.

Al Dr. Benito que en paz descanse, él fue un pilar fundamente en el proyecto de tesis y sus aportaciones serán siempre valiosas.

Al Dr. Pablo Benavides de Facultad de Biología UANL, por darme la capacitación en el modelo biológico *in vivo*, y su grupo de trabajo Santiago, Felipe.

Agradezco a Dios, por la maravillosa familia que siempre ha estado conmigo, Santos Olazarán, Hermelinda Santibáñez, Claudia Berenice Olazarán Santibáñez y Atalía Noemi Olazarán Santibáñez.

A los Doctores: Dr. Gildardo Rivera Sánchez, Dr. Aldo Segura Cabrera y Dr. Carlos García por su las enseñanzas en el área de Química Computacional.

Al Dr. DEB, por su paciencia, amabilidad, por su confianza, sus enseñanzas, su amistad. “Thank you”.

A mis Amig@s de la UTRGV; Chelsea Glibbs, Melissa Cooper, Valerie Cano, Andera Contreras, Sandra Huerta, Yaharia Reyes, Olga Rodriguez, Alma Zinala, Tessa De la Vega, Daniel García, Daniel Cantú, Omar Espino, Ofir Aguilar, Alex Velasco, Javier Pérez, Jonathan Rock, Rajesh Nalluri, Gilberto García, Alejandro Pardo, Armando Paniagua, José Salinas. Les agradezco porque gracias a ustedes la estancia en la UTRGV fue más cálida y placentera.

A los Doctores: Dr. Eder Arredondo, Dr. Omar Dra. Rosario y compañer@s del Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica; Irma Vega, Zulma Pherman, Héctor Ramírez, Silvana Vázquez, Yuridia Martínez, Jorge Solis, Elizeth Pioquinto, Alejandra Ortega, Diego Jaramillo, Tania Rico, Dmp. David Gutiérrez y Dalila Balderas.

A mis Amig@s desde la licenciatura; IQ. Reyes Benites, IQ. Laksmi Nrisimha, MC. Argelia Camacho, QFB Lázaro Camargo, QFB Ricardo González, QFB Josué Flores, QFB Fabián Martínez, QFB Jesús Pachecano y QFB Gastón Guzmán.

En especial quiero agradecer a quienes aportaron con trabajo, esfuerzo y conocimiento en este proyecto; Chelsea Glibbs, Melissa Cooper, Daniel Cantú, Omar Espino y Diego Jaramillo.

Agradezco a la familias aquí representadas por Juan Camacho, Julio Sanchez, Alfonso Alanis y Jesus Cervantes, por sus atenciones, confianza y amor, de corazón muchas gracias.



---

## DEDICATORIA

*A mi Dios Jehová, que hizo los cielos y la tierra.*

A mi **familia**; Santos Olazarán, Hermelinda Santibáñez, Claudia Berenice Olazarán  
Santibáñez y Atalía Noemi Olazarán Santibáñez.

*Va por ti futura esposa, (te amo aun sin conocerte).*

---

**TABLA DE CONTENIDO**

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>III</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>V</b>
<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE GRÁFICAS</b>	<b>XIV</b>
<b>NOMENCLATURA</b>	<b>XV</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. DEFINICIÓN DEL CÁNCER	2
1.1.1. Factores desencadenantes del cáncer	3
1.1.2. Tratamiento contra el cáncer: Quimioterapia	4
1.1.3. Mecanismos de acción de los fármacos antineoplásicos	5
1.1.4. Inmunoterapia	6
1.1.5. Tipos de Inmunoterapia contra el cáncer.	7
1.1.6. Anticuerpos monoclonales como inmunoterapia	8
1.1.7. Terapias combinadas de anticuerpos conjugados a fármacos.	9
1.1.8. Receptor HER-2	10
1.2. ANTECEDENTES	12
1.3. JUSTIFICACIÓN	20
1.4. HIPÓTESIS	21
1.5. OBJETIVOS	22
1.5.1. Objetivo general	22
1.5.2. Objetivos específicos	22

<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
2.1. EQUIPOS Y MATERIALES	23
2.2. METODOLOGÍA	25
2.2.1. Ruta de síntesis de los derivados de 3-amino-azetidin-2-ona	25
2.2.2. Síntesis y caracterización de derivados de iminas aromáticas	26
2.2.3. Síntesis y caracterización de derivados de 3-ftalimida-azetidin-2-ona	26
2.2.4. Síntesis y caracterización de derivados de 3-amino-azetidin-2-onas	27
2.3. ESTRATEGIAS DE CONJUGACIÓN DEL COMPLEJO ANTICUERPO-FÁRMACO	28
2.3.1. Unión del compuesto azetidin-2-ona al enlazador	28
2.3.2. Identificación de complejo Trastuzumab/azetidin-2-ona	30
2.4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	31
2.4.1. Determinación de la actividad anticancerígena y citotóxica	31
2.4.2. Determinación de la apoptosis por la técnica de caspasa-3	31
2.4.3. Ensayo <i>in vivo</i> de la sensibilidad a los fármacos en un modelo murino	32
2.5. SEGURIDAD EN EL LABORATORIO Y DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS	34
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
3.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN	35
3.1.1. Síntesis de derivados de iminas aromáticas	35
3.1.2. Síntesis de derivados de ftalamida-azetidin-2-onas	39
3.1.3. Síntesis de derivados de 3-amino-azetidin-2-onas	48
3.2. ANÁLISIS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR	58
3.2.1. Análisis de acoplamiento molecular de derivados de 3-amino-azetidin-2-ona sobre el sitio activo de la $\beta$ -tubulina	58
3.3. EVALUACIÓN BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i>	62
3.3.1. Actividad citotóxica sobre células Chang	62
3.3.2. Actividad anticancerígena en células SiHa	67
3.3.3. Actividad anticancerígena en células B16F10	72
3.3.4. Actividad anticancerígena en células K562	76

3.3.5. Determinación de la concentración inhibitoria media máxima (CI <sub>50</sub> )	80
<b>3.4. CONJUGACIÓN TRASTUZUMAB/AZETIDIN-2-ONA</b>	<b>81</b>
3.4.1. Selección del derivado de 3-amino-azetidin-2-ona a conjugar con Trastuzumab	81
3.4.2. Conjugación Trastuzumab/azetidin-2-ona	81
3.4.3. Resonancia magnética nuclear de protón de F-12-5t	81
3.4.4. Identificación de la unión del compuesto F-12-5t al Trastuzumab	83
3.4.5. Acoplamiento molecular del compuesto F-12-5t en el sitio de la colchicina	86
<b>3.5. EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL CONJUGADO TRASTUZUMAB/ AZETIDIN-2-ONA</b>	<b>88</b>
3.5.1. Resultados en la línea celular Chang	88
3.5.2. Resultados en la línea celular SiHa	89
3.5.3. Resultados en la línea celular K562	90
3.5.4. Resultados en la línea celular MCF-7	91
3.5.4. Resultados de concentración inhibitoria media máxima del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona.	92
<b>3.6. EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i> DEL CONJUGADO TRASTUZUMAB/AZETIDIN-2-ONA</b>	<b>93</b>
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>97</b>
4.1. Síntesis y caracterización	97
4.1.1. Síntesis química de iminas aromáticas	97
4.1.2. Síntesis química de ftalamida-azetidin-2-ona	98
4.1.3. Síntesis química de 3-amino-azetidin-2-ona	100
4.2. Acoplamiento molecular de derivados de 3-amino-azetidin-2-ona	101
4.3. Evaluación biológica anticancerígena de los compuestos derivados de 3-amino-azetidin-2-ona	101
4.3.1. Actividad citotóxica en células Chang	103
4.3.2. Actividad anticancerígena en células SiHa	103
4.3.3. Actividad anticancerígena en células B16F10	104
4.3.4. Actividad anticancerígena en células K562	104
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>107</b>
<b>6. REFERENCIAS</b>	<b>108</b>

---

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales en fases clínicas.....	8
Tabla 2. Iminas aromáticas obtenidas a través de la reacción de adición cetona-amina .	37
Tabla 3. Principales bandas en los espectros de infrarrojo de las iminas aromáticas.....	39
Tabla 4. Compuestos derivados de ftalamida-azetidin-2-ona en configuración <i>trans</i> ....	41
Tabla 5. Principales bandas en los espectros de infrarrojo de los derivados de ftalamida-azetidin-2-ona en configuración <i>trans</i> .....	43
Tabla 6. Compuestos derivados de ftalamida-azetidin-2-ona en configuración <i>cis</i> .....	45
Tabla 7. Principales bandas en los espectros de infrarrojo de los derivados de ftalamido-azetidin-2-ona en configuración <i>cis</i> .....	47
Tabla 8. Porcentaje de rendimiento de 3-amino-azetidin-2-onas en configuración <i>trans</i>	50
Tabla 9. Principales bandas en los espectros de infrarrojo de los derivados 3-amino-azetidin-2-ona en configuración <i>trans</i> .....	52
Tabla 10. Porcentajes de rendimiento de los compuestos <i>cis</i> -3-amino-azetidin-2-ona...	55
Tabla 11. Principales bandas en los espectros de infrarrojo de los derivados 3-amino-azetidin-2-ona en configuración <i>cis</i> .....	56
Tabla 12. Acoplamiento molecular de los derivados $\beta$ -lactámicos sobre los sitios de unión de la $\beta$ -tubulina .....	59
Tabla 13. Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de <i>trans</i> 3-amino-azetidin-2-ona en células Chang (continúa en tabla 14). .....	63
Tabla 14. Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de <i>trans</i> 3-amino-azetidin-2-ona en células Chang (continuación de tabla 13).....	63
Tabla 15. Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de <i>cis</i> 3-amino-azetidin-2-ona en células Chang.....	66

---

Tabla 16. Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de <i>trans</i> 3-amino-azetidin-2-ona en células SiHa (continúa en la tabla 17).....	68
Tabla 17. Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de <i>trans</i> 3-amino-azetidin-2-ona en células SiHa (continuación de la tabla 16). ....	68
Tabla 18. Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de <i>cis</i> 3-amino-azetidin-2-ona en células SiHa. ....	71
Tabla 19. Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de <i>trans</i> 3-amino-azetidin-2-ona en células B16F10 (continúa en tabla 20).....	72
Tabla 20. Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de <i>trans</i> 3-amino-azetidin-2-ona en células B16F10 (continuación de la tabla 19).....	72
Tabla 21. Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de <i>cis</i> 3-amino-azetidin-2-ona en células B16F10. ....	75
Tabla 22. Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de <i>trans</i> 3-amino-azetidin-2-ona en células K562 (continúa en la tabla 23). ....	76
Tabla 23. Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de <i>trans</i> 3-amino-azetidin-2-ona en células K562 (continuación de la tabla 22). ....	77
Tabla 24. Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de <i>cis</i> 3-amino-azetidin-2-ona en células K562. ....	79
Tabla 25. Concentración inhibitoria cincuenta de los derivados de 3-amino-azetidin-2-ona.....	80
Tabla 26. Porcentajes de citotoxicidad del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona en células Chang.....	89
Tabla 27. Porcentajes de citotoxicidad del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona en células SiHa. ....	90

---

Tabla 28. Porcentajes de citotoxicidad del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona en células K562. ....	91
Tabla 29. Porcentajes de citotoxicidad del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona en células MCF-7. ....	92
Tabla 30. Concentración inhibitoria máxima media de conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona.....	93
Tabla 31. Grupo 1 sobrevivencia y peso de ratones con cáncer sin tratar. ....	94
Tabla 32. Grupo 2 sobrevivencia y peso de ratones con cáncer tratados con Trastuzumab .....	94
Tabla 33. Grupo 3 sobrevivencia y peso de ratones con cáncer tratados con 3-amino-azetidin-2-ona (F-12-3t).....	95
Tabla 34. Grupo 4 sobrevivencia y peso de ratones con cáncer tratados con Trastuzumab/azetidin-2-ona.....	96
Tabla 35. Grupo 5 sobrevivencia y peso de ratones sin cáncer, sin tratar (ratones normales).....	96

---

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Estructura de los compuestos 1 y 2 con actividad anticancerígena sobre líneas celulares de leucemia y carcinoma de colon .....	12
Figura 2. Estructura de los compuestos 3 y 4 con actividad antitumoral.....	13
Figura 3. Estructura de los compuestos 5 y 6 con actividad antitumoral.....	14
Figura 4. Estructura del compuesto 7 con actividad en la línea celular MCF-7 .....	15
Figura 5. Estructura del compuesto 8 con actividad en la línea celular MCF-7 .....	15
Figura 6. Compuesto 10 derivado de azetidin-2-ona.....	16
Figura 7. Ruta de síntesis química de derivados de 3-amino-azetidin-2-onas. ....	25
Figura 8. Síntesis de iminas aromáticas a través de la reacción de ceto-amina .....	26
Figura 9. Síntesis de ftalamida-azetidin-2-onas a través de la reacción de Staudinger ...	27
Figura 10. Reacción de desprotección de grupo amino de la azetidin-2-ona.....	27
Figura 11. Reacción con la Boc-alanina .....	28
Figura 12. Reacción de Trastuzumab con SPP.....	29
Figura 13. Reacción con el ácido dithiodipropiónico .....	30
Figura 15. Diferentes sustituyentes de los compuestos derivados de iminas aromáticas	36
Figura 16. Espectro de infrarrojo del compuesto F-01-1 .....	38
Figura 17. Compuestos obtenidos en una mezcla racémica ( <i>cis</i> y <i>trans</i> ) .....	41
Figura 18. Espectro de infrarrojo del compuesto F-01-2t.....	42
Figura 19. Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto F-01-2t.....	44
Figura 20. Espectro de infrarrojo del compuesto F-01-2c .....	46
Figura 21. Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto F-01-2c .....	48



---

Figura 22. Estructuras de los doce compuestos derivados de 3-amino-azetidin-2-ona en configuración <i>trans</i> .....	50
Figura 23. Espectro de infrarrojo del compuesto F-01-3T.....	51
Figura 24. Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto F-01-3T.....	53
Figura 25. Estructuras de los siete compuestos <i>cis</i> -3-amino-azetidin-2-ona .....	54
Figura 26. Espectro de infrarrojo del compuesto F-01-3c .....	56
Figura 27. Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto F-01-3c en configuración <i>cis</i> .....	57
Figura 28. Secuencia de aminoácidos de la $\beta$ -tubulina humana.....	58
Figura 29. Molécula de $\beta$ -tubulina diseñada. Se indican los sitios de unión a la tubulina del taxol, los derivados de la vinca y la colchicina.....	59
Figura 30. A) Sitio de unión de vinca con la vinblastina, B) Sitio de unión de vinca con F-12-3t, C) sitio de unión de la colchicina con la colchicina, D) sitio de unión de la colchicina con F-12-3t. ....	61
Figura 31. Espectro de RMN del compuesto F-12-5t.....	82
Figura 32. Posibles sitios de unión de la molécula pequeña al anticuerpo .....	83
Figura 33. Los posibles sitios de unión en Trastuzumab .....	83
Figura 34. Espectro de MS – EIS TOF de Trastuzumab-azetidin-2-ona .....	85
Figura 35. Espectro de MS – EIS TOF de Trastuzumab-azetidin-2-ona .....	86
Figura 36. Análisis de la posible interacción química sobre la $\beta$ -tubulina .....	87

---

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Citotoxicidad de derivados de <i>trans</i> -3-amino-azetidin-2-ona (F-01-3t a F-06-3t) sobre células Chang. ....	64
Gráfica 2. Citotoxicidad de derivados de <i>trans</i> -3-amino-azetidin-2-ona (F-07-3t a F-12-3t) sobre células Chang. ....	65
Gráfica 3. Citotoxicidad de derivados de <i>cis</i> -3-amino-azetidin-2-ona sobre células Chang .....	67
Gráfica 4. Citotoxicidad de derivados <i>trans</i> -3-amino-azetidin-2-ona (F-01-3t a F-06-3t) sobre células SiHa.....	69
Gráfica 5. Citotoxicidad de derivados <i>trans</i> -3-amino-azetidin-2-ona (F-07-3t a F-12-3t) sobre células SiHa.....	70
Gráfica 6. Citotoxicidad de derivados <i>cis</i> -amino-azetidin-2-ona sobre células SiHa. ....	71
Gráfica 7. Citotoxicidad de derivados <i>trans</i> -3-amino-azetidin-2-ona (F-01-3t a F-06-3t) sobre células B16F10 .....	73
Gráfica 8. Citotoxicidad de derivados <i>trans</i> -3-amino-azetidin-2-ona (F-07-3t a F-12-3t) sobre células B16F10 .....	74
Gráfica 9. Citotoxicidad de derivados <i>cis</i> -amino-azetidin-2-ona sobre células B16F10.	75
Gráfica 10. Citotoxicidad de derivados <i>trans</i> -3-amino-azetidin-2-ona (F-01-3t a F-06-3t) sobre células K562.....	77
Gráfica 11. Citotoxicidad de derivados <i>trans</i> -3-amino-azetidin-2-ona (F-07-3t a F-12-3t) sobre células K562.....	78
Gráfica 12. Citotoxicidad de derivados <i>cis</i> -amino-azetidin-2-ona sobre células K562...	79

---

**NOMENCLATURA**

<b>Símbolo o abreviatura</b>	<b>Significado</b>
°C	Grados Celsius
Abs	Absorbancia
AcM	Anticuerpo monoclonal
ADC (CAF)	Conjugación anticuerpo fármaco
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
B16F10	Melanoma
BRO	Melanoma Humano
CA-432	Combretastatin A-432
CCF	Cromatografía en capa fina
CD-20	Antígeno CD-20
CI <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria cincuenta
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Conc	Concentración
CPT-11	Carcinoma de colon
Chang	Células del hígado
DCM	Diclorometano
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfoxido

---

DMSO d <sub>6</sub>	Dimetil sulfóxido deuterado
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Lector para ensayos inmunoenzimáticos
Fab	Fragmento de unión al antígeno
Fc	Fragmento cristizable
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
HER-2	Receptor tirosina quinasa 2
HL-60	Leucemia
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
h	Horas
HT-29	Carcinoma de colon
Hz	Hertz
IL-2	Interlucina
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K-562	Leucemia
MCF-7	Carcinoma de mama
MDA-MB-231	Carcinoma de mama
MEM	Medio enriquecido mínimo
MHz	MegaHertz
min	Minutos

---

MTX	Metotexato
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NaSO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio
nM	Nanomolar
OMS	Organización Mundial de la Salud
PASS	Programa de predicción de espectro de la actividad de sustancias
PBS	Buffer de fosfatos salinos
PC-3	Carcinoma prostático
PDB	Banco de datos de proteínas
pH	Potencial hidrógeno
ppm	Partes por millón
PyBOP	(benzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidino)fosfonio
REA	Relación estructura-actividad
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de protón
SFB	Suero fetal bovino
SiHa	Carcinoma cervicouterino
SKVO-3	Carcinoma de ovario
SPP	<i>N</i> -succinimidil-4-(2-piridiltio) pentanoato
SS	Secretaría de Salud
T	Temperatura

---

T-DM1	Trastuzumab-Emtansine
TEA	Trietilamina
WST-1	2-(4 yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5- (2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar

---

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud, informó que el cáncer fue una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial con aproximadamente 8.2 millones de casos en 2012<sup>1</sup>. En América Latina, la Organización Panamericana de la Salud reportó que en el periodo de 2007 a 2009, la tasa de mortalidad promedio a consecuencia del cáncer fue de 110.7 muertes por cada 100 mil habitantes y de acuerdo con la Sociedad Americana contra el Cáncer, se estimó que en el 2013 en Estados Unidos habría más de un millón de nuevos casos y hasta 500,000 defunciones<sup>2</sup>. México, presenta la tasa de mortalidad más baja de Latinoamérica con 75.4 muertes por cada 100 mil habitantes pero a nivel nacional, el cáncer ocupa el tercer lugar en incidencia<sup>3</sup>.

Existen diferentes tratamientos para el cáncer siendo los principales; la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Además, existen terapias auxiliares como la terapia fotodinámica e inmunoterapia<sup>4</sup>. El efecto terapéutico de los diferentes fármacos antineoplásicos varía según la dosis a la que se administre, sin embargo, debido a su alta toxicidad a otros órganos importantes como el hígado, estómago y corazón, presentando una gran limitación, debido a su escasa especificidad, destruyendo a otras células y tejidos normales principalmente las que se encuentran en división celular activa<sup>5</sup>.

Es por este motivo que se planteó la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que puedan ayudar al tratamiento del cáncer, presentándose los compuestos derivados de 3-amino-azetidin-2-onas como candidatos competentes y viables debido a que

evidencian una potente actividad anticancerígena en líneas celulares cancerígenas. Por lo tanto, se planteó el diseño de nuevos derivados de 3-amino-azetidin-2-ona con una posible mayor especificidad al ser conjugado con un anticuerpo monoclonal anti-Her-2 (Trastuzumab), siendo caracterizados por técnicas espectrométricas de ESI-QSTAR XL. La evaluación biológica *in silico* e *in vitro* del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona, se realizó en un modelo computacional de la  $\beta$ -tubulina y mediante la determinación de la actividad anticancerígena en las líneas celulares SIHA, B16F10, K562 y Chang, así como su evaluación biológica *in vivo* en un modelo murino de ratones C57BL/6.

## 1.1. DEFINICIÓN DEL CÁNCER

Estudios realizados por GLOBOCAN<sup>6</sup>, indican que existen 14,1 millones de nuevos casos de cáncer y 8,2 millones de muertes se produjeron en 2012. Con los años, la incidencia se ha desplazado a los países menos desarrollados, que actualmente representan alrededor del 57% de los casos y el 65% de las muertes por cáncer en países en vías de desarrollo<sup>1</sup>. Los principales tipos de cáncer son: pulmonar, gástrico, hepático, colorrectal y mamario. Aproximadamente el 70% de las defunciones debidas a cáncer se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Se espera que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 11 millones en 2030<sup>1</sup>. Además en México, la Secretaría de Salud (SS) reportó que el 8.7% de los ingresos hospitalarios por cáncer fueron debido a la leucemia en menores de 17 años, en los hombres mayores de 25 años, el cáncer más frecuente es la leucemia (15.1%), mientras que en las mujeres es el cáncer de mama (8.4 %)<sup>2</sup>. La incidencia de cáncer de mama fue de 14.63 por cada 100 mil mujeres mayores de 14 años. Entre las



mujeres de 60 años y mayores, el cáncer cervicouterino tiene una tasa de mortalidad de 41.88 por cada 100 mil mujeres.<sup>2</sup>

El cáncer es un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos, que puede originarse a partir de cualquier tipo de célula, en cualquier tejido corporal<sup>3</sup>. Existen varias de formas distintas, siendo tres los principales grupos: los sarcomas, que proceden del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo; los carcinomas, procedentes de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, así como de los tejidos glandulares de la mama y próstata, y las leucemias y linfomas, que abarcan los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas, producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea y sobreproducción de células blancas inmaduras. De ellos, los carcinomas son considerados los cánceres más frecuentes, constituyen un 90% del total de los tres tipos<sup>3</sup>.

#### **1.1.1. Factores desencadenantes del cáncer**

Ciertos factores son capaces de originar cáncer en un porcentaje de los individuos expuestos a ellos. Entre éstos se encuentran la herencia, los productos químicos, las radiaciones ionizantes, las infecciones por virus y traumas. Distintos grupos de investigación mencionan los diferentes factores que pueden llegar a producir un cáncer<sup>7</sup>. El cáncer es, en esencia, un evento genético. Las alteraciones genéticas pueden ser heredadas, o producidas en alguna célula por un virus o por una lesión provocada de manera externa<sup>5</sup>.

Los principales tratamientos para el cáncer, son la cirugía, la radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia, existen terapias auxiliares o alternativas como la terapia fotodinámica<sup>8</sup>. Los tratamientos para el cáncer tienen como objetivo mejorar la calidad de vida a través de la inhibición de la proliferación celular cancerígena. Para un mejor tratamiento es necesario un diagnóstico exacto de las líneas celulares afectadas<sup>5</sup>.

### **1.1.2. Tratamiento contra el cáncer: Quimioterapia**

La quimioterapia es empleada en el tratamiento de las enfermedades cancerígenas, que tienen como función actuar sobre la división celular (mitosis) de las células cancerosas. Los fármacos empleados en la quimioterapia se denominan medicamentos citostáticos o citotóxicos. Los fármacos tienen diferentes mecanismos de acción; en la síntesis de ácidos nucleicos o síntesis de proteínas. El efecto terapéutico tiene un espectro corto en la dosis a la que se administre, estando cercana a la toxicidad medicamentosa. La quimioterapia tiene una gran limitación, que es su escasa especificidad, debido que afecta a otras células y tejidos normales del organismo, sobre todo si se encuentran en división activa.

Actualmente, existen más de 100 medicamentos diferentes para combatir la enfermedad y prevenir el crecimiento, multiplicación y la diseminación de células malignas. La terapia consiste en la administración de fármacos citotóxicos, normalmente por vía intravenosa, capaces de impedir la proliferación y crecimiento de células malignas, destruyendo el tumor o reduciendo la masa tumoral. Los fármacos antineoplásicos tienen acción directa sobre diversas partes vitales de la célula, paralizando la división celular<sup>5</sup>.

---

### 1.1.3. Mecanismos de acción de los fármacos antineoplásicos

Los mecanismos de acción de cada uno de los grupos de fármacos anticancerosos son los siguientes:

- **Fármacos antimetabolitos:** Interfieren en los pasos de la síntesis del ADN o ARN. En este grupo se encuentra por ejemplo el metotrexato, inhibidor de la dihidrofolato-reductasa, que es una enzima metabólica limitante al participar en la transferencia de grupos monocarbonados en muchas reacciones esenciales para la célula, como la síntesis de aminoácidos y bases nitrogenadas. Otro ejemplo son los análogos de bases pirimidínicas, como el 5-fluorouracilo que lesiona las células por dos mecanismos: inhibiendo la timidilato-sintetasa e incorporándose a la molécula de ARN.
- **Inhibidores de las Topoisomerasas:** Las topoisomerasas del ADN son enzimas nucleares que controlan, mantienen y modifican la estructura y la topología del ADN durante los procesos de replicación y transcripción del material genético. Los inhibidores ejercen su acción a este nivel estimulando y estabilizando los complejos ADN-enzima, lo que provoca la escisión mantenida de la cadena de ADN y la consecuente pérdida de su función. Ejemplos de este tipo de compuestos son el irinotecán (Campto) y el topotecán (Hycamtin). Una reacción adversa en este tipo de tratamiento es la leucopenia.
- **Agentes Alquilantes:** Su acción citotóxica se manifiesta mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y diversas

moléculas nucleofílicas presentes en las células. Actúan preferentemente a nivel de las bases nitrogenadas del ADN. También pueden reaccionar con los grupos fosfato y alquilar bases del ARN. Las mostazas nitrogenadas como ciclofosfamida (Genoxal) e ifosfamida (Tronoxal) son agentes alquilantes bifuncionales. La toxicidad más frecuente es la mielodepresión.

- Antibióticos Antitumorales: En su mecanismo de acción destaca su capacidad para intercalarse entre los pares de bases adyacentes de ADN y fijarse con intensidad. También son capaces de inhibir la topoisomerasa II. Un ejemplo de ellos es la doxorubicina (Adriamicina), la cual forma radicales libres que pueden afectar al ADN, alterar la membrana, inhibir la fosforilación oxidativa de las mitocondrias e inhibir diversas enzimas relacionadas con el ADN.
- Fijadores a la Tubulina: El paclitaxel (Taxol) es el producto activo del *Taxus brevifolia*. El cual se une de manera reversible a la subunidad beta de la tubulina, favoreciendo la polimerización en microtúbulos. El taxol es activo sobre tumores sólidos frecuentemente resistentes a otros fármacos. Produce leucopenia o neutropenia<sup>6</sup>.

#### 1.1.4. Inmunoterapia

La inmunoterapia o también llamada terapia biológica o bioterapia, es un tratamiento que utiliza varias partes del sistema inmunológico de un ser humano para combatir enfermedades como el cáncer. Esta se puede dividir en dos diferentes modalidades:

- Estimulando el propio sistema inmune para trabajar eficientemente y de forma más inteligente para atacar las células cancerosas.
- Proporcionando componentes del sistema inmune, tales como proteínas artificiales (anticuerpos).

En las últimas décadas la inmunoterapia se ha convertido en una parte importante del tratamiento de algunos tipos de cáncer. Actualmente se están estudiando nuevos tratamientos inmunológicos, y se prevé que tengan un impacto positivo en los próximos años.

La inmunoterapia tiene una importante ventaja sobre otras terapias, pero uno de sus más grandes defectos es que al ser tan específica, solo puede funcionar en algunos tipos de cáncer de ciertos grupos de pacientes. En algunos casos se utiliza como monoterapia, pero en su gran mayoría se utiliza como adyuvante en otras terapias<sup>9</sup>.

#### **1.1.5. Tipos de Inmunoterapia contra el cáncer.**

Los principales tipos de inmunoterapia que se utilizan para tratar el cáncer incluyen:

- **Los anticuerpos monoclonales:** Estos son versiones sintéticas de las proteínas del sistema inmune. Los anticuerpos pueden ser muy útiles en el tratamiento anticancerígeno, ya que pueden ser diseñados para atacar a una parte muy específica de una célula cancerosa.
- **Inhibidores de punto de control inmunológico:** Estos medicamentos tienen básicamente los "frenos" para evitar la evasión del sistema inmunológico, lo que ayuda a reconocer y atacar las células cancerosas.

- **Vacunas contra el cáncer:** Las vacunas son proteínas con ciertas modificaciones específicas para presentar algunos antígenos, y así pueda iniciar una respuesta inmune contra ciertas enfermedades cancerígenas<sup>7</sup>.

#### 1.1.6. Anticuerpos monoclonales como inmunoterapia

La investigación en el diseño de nuevos anticuerpos monoclonales se centraliza en la búsqueda de algún antígeno específico del cáncer. Los anticuerpos monoclonales se usan actualmente para el tratamiento de muchas enfermedades, incluyendo algunos tipos de cáncer.

En los últimos años, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) ha aprobado más de una docena de anticuerpos monoclonales para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. A medida que las investigaciones han crecido se ha logrado encontrar más antígenos relacionados con el cáncer. Actualmente, existen anticuerpos monoclonales en fases clínicas para distintas dianas terapéuticas (Tabla 1)<sup>10</sup>.

**Tabla 1.** Anticuerpos monoclonales en fases clínicas

<i>AcM o código</i>	<i>Objetivo</i>	<i>Fase clínica</i>
<i>Necitumumab</i>	EGFR	Fase III
<i>SYM004</i>	EGFR	Fase II
<i>RO5083945, RG7160, GA201</i>	EGFR	Fase II
<i>Trastuzumab emtansine</i>	HER-2	Fase III
<i>GTMA7.3 GEX</i>	HER-2	Fase I
<i>Veltuzumab</i>	CD-20	Fase II
<i>Ublituximab</i>	CD-20	Fase I

<i>Icrucumab</i>	VEGFR-1	Fase II
<i>Ramucirumab</i>	VEGFR-2	Fase III

Mientras que la porción del fragmento cristalizable (Fc) de los anticuerpos puede activar mecanismos mediados por el sistema inmune, la porción del fragmento de unión al antígeno de los mismos tiene actividad de unión específica al antígeno (Fab). De hecho, varios anticuerpos terapéuticos no conjugados se han diseñado para unirse a los receptores del factor de crecimiento celular o de moléculas de señalización de la superficie y son capaces de inhibir la proliferación o inducir la muerte celular directa.

#### 1.1.7. Terapias combinadas de anticuerpos conjugados a fármacos.

Los anticuerpos conjugados a fármacos o toxinas (ADC, por sus siglas en inglés), en contraste a los anticuerpos no conjugados, están diseñados específicamente para inducir o bloquear la proliferación, o generar apoptosis<sup>11</sup>. Ejemplos de fármacos que se han vinculado con éxito a anticuerpos incluyen:

- (1) Caliqueamicina y Duocarmicina, que se unen al surco menor del ADN, inducen roturas de doble cadena y apoptosis en dosis bajas (por ejemplo, gentuzumab ozogamicina, CD22-caliqueamicina)<sup>12</sup>.
- (2) Monometil Auristatina E y derivados tales como Maitansina Emtansina (DM1) y DM4, todos los cuales son agentes anti-tubulina (por ejemplo, Brentuximab Vedotin, Trastuzumab-DM1)<sup>13</sup>.
- (3) Fragmentos de toxinas tales como el fragmento PE38 de *Pseudomonas exotoxina* (por ejemplo, moxetumomab pasudotox, un CD22-PE38).

Los ADC se unen a dianas de tumor, se internalizan y liberan el fármaco o la toxina dentro de la célula en la que bloquean la proliferación y / o inducen la apoptosis. Este es el caso por ejemplo de daclizumab, un anticuerpo anti-CD25 (IL2 $\alpha$ ), que inhibe la señalización de Interleucina-2 (IL-2) y se ha utilizado en el tratamiento del rechazo de trasplante de órganos y en algunas enfermedades autoinmunes. La internalización de los antígenos después de la unión de anticuerpos es relativamente común y compartida por un gran número de ellos, aunque no todos; por ejemplo, el receptor de la transferrina, CD33, CD30, CD19 y CD133<sup>14</sup>.

Otros anticuerpos que han demostrado actividad en la inhibición de la proliferación o la inducción de apoptosis, incluyen anti-CD20<sup>15</sup>, anti-HLA-DR<sup>16</sup>, anti-CD37<sup>17</sup> y anti-CD30<sup>18</sup>, así como los anticuerpos dirigidos contra los receptores de señalización de apoptosis, tales como receptores de TRAIL, DR4 y DR5<sup>19</sup>.

### **1.1.8. Receptor HER-2**

Un ejemplo importante dentro de este grupo de anticuerpos es Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal dirigido al receptor 2 de crecimiento epidérmico (HER-2 por sus siglas en inglés) y Cetuximab, un anticuerpo dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR por sus siglas en inglés, también llamado HER-1). HER-2 es un receptor nuclear perteneciente a la familia de receptores de factores de crecimiento epidérmico, presente en células epiteliales y se encuentra sobreexpresado en un subconjunto de carcinomas de ovario, de mama y gástrico, así como en carcinomas endometriales. No se une por sí mismo a cualquier ligando, pero dimeriza con HER-1 (EGFR), HER-3 y HER-4 u homodimeriza cuando se sobreexpresa, dando lugar a la transducción de señales<sup>20</sup>. El Trastuzumab inhibe la dimerización de HER-2 y la

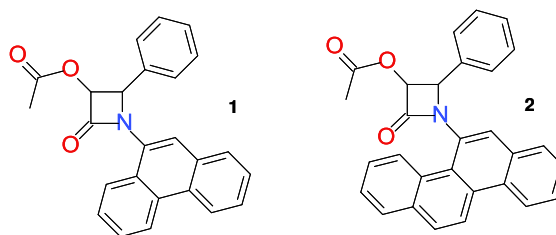


---

señalización con su ligando, por lo tanto, inhibe el crecimiento celular. El EGFR es otro objetivo para el diseño de anticuerpos expresados por las células epiteliales y como ejemplo de estos se encuentra Cetuximab, un anti-EGFR que se está utilizando en el tratamiento de carcinoma colorrectal y cáncer de pulmón de células pequeñas. Tanto Trastuzumab como Cetuximab, además de bloquear las señales proliferativas de las células, también pueden disminuir la expresión de sus antígenos diana (HER-2 y EGFR) a través de la internalización y/o desprendimiento del receptor, lo que disminuye la capacidad de señalización del receptor<sup>21</sup>.

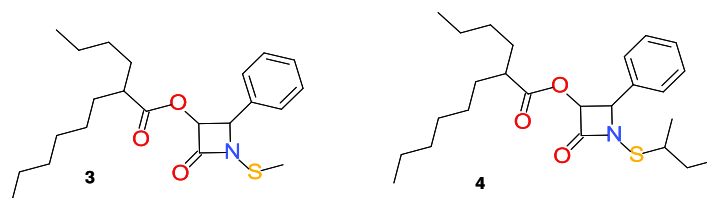
## 1.2. ANTECEDENTES

Banik y cols. (2003-12) llevaron a cabo la síntesis estereoselectiva, estereodivergente, asimétrica y estereocontrolada de nuevos derivados de azetidin-2-onas con iminas poliaromáticas, empleando la reacción de Staudinger. El estudio de relación estructura-actividad (REA), reveló que los compuestos 1-*N*-crisenil y 1-*N*-fenantrenil 3-acetoxi-4-fenil-azetidin-2-onas (Figura 1) (**1**, **2**) tienen actividad potente sobre líneas celulares cancerígenas. Posteriormente, realizaron estudios del mecanismo de acción de derivados de azetidin-2-onas, evaluando ensayos biológicos de apoptosis, mutagenicidad, interacción con las topoisomerasas y actividad en el ciclo celular. Los estudios de citotoxicidad mostraron que el compuesto **1** tiene una inhibición celular en 5 de 7 líneas celulares con actividad superior a la del cisplatino, los resultados fueron: BRO (melanoma) 6.1  $\mu\text{M}$ ; MDA-MB-231 (carcinoma de mama) 0.8  $\mu\text{M}$ ; SKVO-3 (carcinoma de ovario) 6.8  $\mu\text{M}$ ; PC-3 (carcinoma de próstata) 1.4  $\mu\text{M}$ ; HL-60 (Leucemia) 0.7  $\mu\text{M}$ ; K-562 (Leucemia) 1.1  $\mu\text{M}$  y HT-29 (carcinoma colorrectal) 0.7  $\mu\text{M}$ , además de ser inductores de la apoptosis y no presentar interacción con las topoisomerasas<sup>22, 23, 24, 25</sup>.



**Figura 1.** Estructura de los compuestos 1 y 2 con actividad anticancerígena sobre líneas celulares de leucemia y carcinoma de colon

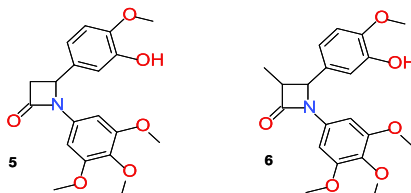
Frezza y cols. (2008) llevaron a cabo el desarrollo de agentes antitumorales, que preferentemente pudieran tener una actividad selectiva sobre las células malignas, con un nivel de toxicidad comparable al de los controles utilizados. En este estudio determinaron que ciertos derivados de *N*-aquiltiolato-azetidin-2-onas pueden dañar el ácido desoxirribonucleico (ADN), son inductores de la apoptosis en distintas líneas celulares tumorales y presentan menor efecto en células no transformadas; describiendo dos análogos de azetidin-2-onas, **3** y **4** (Figura 2), ambos potentes inductores de la apoptosis. Además, el compuesto **3** mostró una mayor actividad biológica *in vitro* que el compuesto **4**, debido a las modificaciones estructurales hechas en las posiciones N<sub>1</sub> y C<sub>3</sub> del anillo de azetidin-2-ona. Por otra parte, los derivados de azetidin-2-onas fueron capaces de inhibir el crecimiento del tumor en ratones, teniendo xenoinjertos de cáncer de mama de la línea celular MDA-MB-231, esto asociado con la inducción de daño en el ADN. Los resultados muestran a estas azetidin-2-onas como potenciales agentes antitumorales<sup>26</sup>.



**Figura 2.** Estructura de los compuestos 3 y 4 con actividad antitumoral

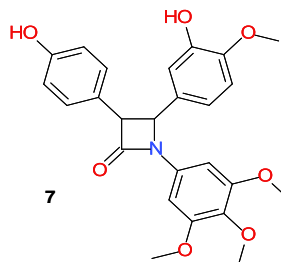
Carr y cols. (2010) llevaron a cabo la síntesis y el estudio de REA, de una serie de análogos de combretastatina que contienen 1,4-diaril-azetidin-2-ona. Los compuestos más potentes fueron el **5** y **6** (Figura 3) con actividad antiproliferativa en concentraciones nanomolares cuando se evaluaron contra líneas celulares humanas de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231). El compuesto **5** ejerció efectos

antimitóticos a través de la inhibición de la polimerización de tubulina posterior a la fase G<sub>2</sub> de la mitosis, causando la detención del ciclo celular en las células de cáncer de mama, con una actividad similar a la del control combretastatina A-4<sup>27</sup>.



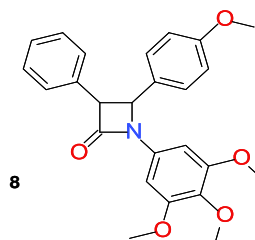
**Figura 3.** Estructura de los compuestos 5 y 6 con actividad antitumoral

O'Boyle y cols. (2010) llevaron a cabo la síntesis y ensayos de la actividad antiproliferativa de una serie de análogos de combretastatina A-4, los cuales contienen el fragmento 1,4-diaril azetidin-2-ona. Dichos análogos mostraron una potente actividad a concentraciones nanomolares en líneas celulares humanas MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama, donde muestran una inhibición *in vitro* de la polimerización de la tubulina, sin causar citotoxicidad significativa en condiciones normales de células epiteliales de mama. El compuesto 4-(3-hidroxi-4-metoxi-fenil) sustituido **7** (Figura 4), mostró la actividad antiproliferativa más potente de la serie. Este compuesto en particular mostró actividad a una concentración subnanomolar en la línea celular MCF-7 ( $CI_{50} = 0.8$  nM), Estas moléculas fueron identificadas como precursores potencialmente útiles para el desarrollo de agentes antitumorales que tengan como objetivo la inhibición de la polimerización de la tubulina<sup>28</sup>.



**Figura 4.** Estructura del compuesto 7 con actividad en la línea celular MCF-7

O'Boyle y cols. (2011) describieron la REA antiproliferativa de las azetidin-2-onas con modificaciones en la posición 4 del anillo. La síntesis de estas series de compuestos se logró utilizando las reacciones de Staudinger y Reformatsky<sup>29</sup>. La actividad antiproliferativa fue probada en células MCF-7 donde el compuesto sustituido 4-(4-metoxi) fenil (**8**) (Figura 5), mostró la actividad más potente con un valor de  $CI_{50}$  de 0.22  $\mu$ M. El mecanismo de acción demostrado fue por inhibición de la polimerización de la tubulina. Este compuesto condujo a la retención de la línea celular MCF-7 en la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular e inducción de apoptosis; aunado a ello, se demostró la interrupción de la mitosis por el compuesto **8** en células de cáncer de mama, al confirmarse la formación de células gigantes multinucleadas<sup>30, 31,32</sup>.

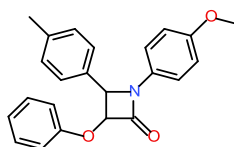


**Figura 5.** Estructura del compuesto 8 con actividad en la línea celular MCF-7

Greene y cols. (2010) demostraron que la combretastatina A-4 y el compuesto CA-432 derivado de azetidin-2-ona, logra la despolimerización de la red de tubulina en células derivadas del carcinoma cervical. Ambos compuestos indujeron el desmontaje de

los microtúbulos, dando lugar a la fosforilación de BubR1, la cual correlaciona con la detención en el ciclo celular en la fase G<sub>2</sub> de la mitosis, provocando la inducción al proceso de apoptosis en las células<sup>33,34</sup>. Además en 2012, a estos mismos compuestos se les determinó la actividad de autofagia a través de microscopía electrónica y el aumento de expresión de las proteínas asociadas a los microtúbulos 1A/1B cadenas 3A/LC3A (LC3-II)<sup>35</sup>.

Olazarán y cols. (2013) llevaron a cabo la síntesis y evaluación biológica *in vitro* de derivados de 3-fenoxi y 3-metoxi azetidin-2-ona con potencial actividad anticancerígena, logrando a través de la reacción de Staudinger, la obtención de 16 derivados de azetidin-2ona, los cuales fueron confirmados por espectroscopia de infrarrojo y resonancia magnética nuclear de protón<sup>36 37</sup>. La evaluación biológica *in vitro* mostró que el compuesto **10** (Figura 6), presenta unas CI<sub>50</sub> en células de cáncer cervicouterino SiHa CI<sub>50</sub>=0.072μM y en células de melanoma B16F10 (CI<sub>50</sub>=1.21μM) pero una menor citotoxicidad en células de hígado, Chang (CI<sub>50</sub> >10.00μM), además de ser inductor de la apoptosis, confirmado por ensayos de actividad de caspasa-3 y de análisis de expresión génica. Mediante un análisis de modelado molecular se propuso una interacción del compuesto **10** en el sitio de unión de la colchicina a la β-tubulina<sup>38 39</sup>.



**Figura 6.** Compuesto 10 derivado de azetidin-2-ona

Una tendencia importante en el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer, es generar y probar la efectividad de moléculas combinadas o quiméricas que favorezcan

no sólo la acción terapéutica, sino además mejoren la selectividad del compuesto en evaluación. En ese sentido, se han probado diversas moléculas que, por sus antecedentes o actividad, se han encontrado preferentemente expresadas o potenciadas en células cancerosas. Estas se han tornado en blancos atractivos cuyas características permiten diseñar moléculas ligando que funcionen como vehículos sitio-dirigidos de tal manera que una vez que son administrados, se concentren particularmente en las células portadoras de la molécula blanco para dicho ligando. Reichert y cols, (2012) presentan un análisis de la literatura de las terapias bio-dirigidas, tales como los anticuerpos monoclonales (AcM) que han demostrado ser eficaces como terapia contra el cáncer. Los estudios clínicos realizados muestran resultados alentadores por la alta selectividad que los caracteriza. Entre las tendencias de desarrollo de nuevos AcM, se incluye el diseño de conjugado fármaco-anticuerpo (ADC, por sus siglas en inglés) y anticuerpos bioespecíficos. Algunas dianas terapéuticas para cáncer probadas bajo estas estrategias, son el EGFR y el HER-2 ya mencionados anteriormente, en los que los esfuerzos más recientes se han dirigido a la exploración de sus mecanismos de acción, así como la efectiva generación de una respuesta inmunológica<sup>40</sup>. Her-2 es una glicoproteína estimuladora del crecimiento celular que se ha visto sobreexpresada en diversos tipos de cáncer, tales como: gastrointestinal, colorrectal, mama, próstata y vejiga<sup>41</sup>; mostrando una relación directamente proporcional entre las concentraciones del receptor y la progresión de la enfermedad. Por este motivo, diversos autores han sugerido a Her-2 como un excelente blanco inmunológico. En un estudio realizado en pacientes con carcinoma de células escamosas de esófago, se encontró que el 30% del grupo mostraba una sobreexpresión de este regulador, lo que los hacía candidatos idóneos para un tratamiento inmunológico basado en esta molécula<sup>42</sup>.

La estrategia que se ha seguido para probar estas proteínas selectivas de células cancerígenas como posibles blancos terapéuticos es mediante la generación de anticuerpos monoclonales que permitan la interacción altamente específica entre éstos y sus respectivas contrapartes, de tal manera que se han probado bajo diversos ensayos, anticuerpos anti-HER-2 como vehículos orquestadores del transporte de agentes terapéuticos en modelos de ADC con resultados prometedores<sup>39</sup>.

Lewis y cols. (2008) determinaron *in vitro* e *in vivo* la eficacia y toxicidad de Trastuzumab (Anti-HER2)-maitansinoide, los cuales habían sido conjugados con el enlazador disulfuro y tioéter, evaluando su actividad anticancerígena en células normales y tumorales y en estudios *in vivo* en un modelo de ratón de cáncer de mama<sup>43</sup>.

Barok y cols. (2011) hacen mención que el fármaco Trastuzumab, que es utilizado en el tratamiento del cáncer de mama con HER2-positivo, se probó con resultados alentadores en uno de cada cinco pacientes. En ese sentido, se planteó la conjugación de Trastuzumab con el fármaco citotóxico Emtansine (T-DM1), el cual muestra una fuerte inhibición del crecimiento celular, incluso con niveles moderados de expresión de HER-2 en el cáncer de mama. Histológicamente, la respuesta celular condujo a la inducción de apoptosis y el bloqueo en el proceso de mitosis, sugiriéndolo como un posible mecanismo de acción de T-DM1<sup>44</sup>.

Para permitir la unión y liberación del complejo azetidin-2-ona/anticuerpo anti-HER-2 es necesario un enlazador específico. Los enlazadores disulfuros de ADC, han sido ampliamente utilizados ya que son estables a pH fisiológico y liberan su carga útil después de la internalización en las células, en donde el citosol proporciona un entorno mucho más reductor en comparación con el medio extracelular. Los enlazadores disulfuros de ADC utilizan la modificación química del grupo amino primario de los



---

residuos de lisina o del grupo tiol de las cisteínas para hacer la fusión anticuerpo fármaco. El diseño de liberación se basa en la proteólisis de los aminoácidos modificados, logrando así la liberación intracelular del compuesto azetidin-2-ona<sup>45</sup>.

Es claro que las moléculas ADC podrían abrir un futuro promisorio en el tratamiento sitio-dirigido y específico del cáncer, de ahí que, bajo estos antecedentes, en el presente trabajo se propone la síntesis y funcionalización de compuestos derivados de azetidin-2-ona conjugados a anti-HER-2 en forma de ADC, como una prometedora alternativa para el tratamiento del cáncer.

---

### 1.3. JUSTIFICACIÓN

Es necesario el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas contra el cáncer mucho más potentes pero también más específicas y bio-dirigidas a las células neoplásicas, ya que la mayoría de los agentes quimioterapéuticos actuales son inespecíficos en su actividad y provocan muchos efectos indeseables en los pacientes. Tener opciones que puedan aplicarse en menores dosis, dada su alta especificidad o la capacidad de dirigirlos a lugares específicos, podría permitir en el futuro dar una mejor calidad de vida a los pacientes en tratamiento.

---

### 1.4. HIPÓTESIS

El compuesto derivado de azetidin-2-ona conjugado con el anticuerpo Trastuzumab presentará una actividad anticancerígena *in vitro* e *in vivo*, más efectiva que su contraparte no conjugada.

---

## 1.5. OBJETIVOS

### 1.5.1. Objetivo general

Sintetizar y evaluar *in vitro* compuestos derivados de azetidin-2-ona mono y poliaromáticos para determinar su actividad como potenciales agentes anticancerígenos, seleccionando el más potente para unirlo a Trastuzumab, y evaluar *in vitro* e *in vivo* la respuesta como molécula conjugada.

### 1.5.2. Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar compuestos derivados de 3-amino-azetidin-2-onas monoaromáticos y poliaromáticos.
- Evaluar biológicamente *in vitro* la actividad anticancerígena y citotóxica en las líneas celulares MCF-7, K562, SiHa y Chang de los compuestos 3-amino-azetidin-2-ona.
- Evaluar biológicamente *in silico* la afinidad de los compuestos 3-amino-azetidin-2-ona sobre la  $\beta$ -tubulina.
- Conjugar el derivado de azetidin-2-ona con mayor actividad citotóxica al anticuerpo anti-HER-2 Trastuzumab.
- Evaluar biológicamente *in vitro* la actividad anticancerígena y citotóxica en las líneas celulares MCF-7, K562, SiHa y Chang, el conjugado Trastuzumab /azetidin-2-ona.
- Evaluar biológicamente *in vivo* la actividad antineoplásica del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona en un modelo murino.

---

## CAPÍTULO 2

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. EQUIPOS Y MATERIALES

Los equipos utilizados para este proyecto se encuentran en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y son los siguientes; Módulos para cultivo celular (Incubadoras con agitación y de CO<sub>2</sub>), Campana de cultivo microbiano, Campana de bioseguridad nivel II, Espectrofotómetro UV-VIS, planchas con agitación, centrífuga, microscopios, estereoscopio y unidades de enfriamiento), Módulo para Análisis de proteínas (Biofotómetro, Cámaras de electroforesis vertical, Lector de microplacas). Módulo para extracción, análisis y manipulación de ácidos nucleicos (Campana de extracción, microcentrífugas, cámaras de electroforesis vertical y horizontal, fuentes de poder, vortex, termocicladores, fotodocumentador)

Los equipos utilizados en el proyecto durante la estancia en la Universidad de Texas Rio Grande Valley del laboratorio de Química Orgánica, fueron los siguientes; Placas de calentamiento, Sistema de reflujo, Columnas de fase móvil, Campanas de extracción, Luz ultravioleta para cromatografía de capa fina, Espectrofotómetro de Infrarrojo, Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protón y de Carbono 13.

- **Cromatografía de capa fina.**

Para determinar la pureza de los compuestos obtenidos se realiza la cromatografía de capa fina (CCF).

Se coloca la muestra a un centímetro del borde en uno de los extremos de la placa, se deja secar, se coloca la placa en un envase que contiene una pequeña cantidad del solvente orgánico, se tapa y se deja correr por unos minutos<sup>46</sup>. El solvente sube por polaridad arrastrando las moléculas, las cuales se mueven según la afinidad que muestren por la fase estacionaria. La separación de los compuestos se observó mediante la luz ultravioleta utilizando el aparato UVS-11 mineralight.

- **Espectroscopía de Infrarrojo**

El procedimiento consiste en adicionar 2 mg de la muestra sólida, en el equipo ALPHA FT-IR Spectrometer. Los espectros obtenidos muestran bandas de absorción de cada uno de los enlaces de la estructura expresadas en centímetros a la menos uno ( $\text{cm}^{-1}$ ), siendo en algunas ocasiones identificadas como intensas (I), moderadas (M) y débiles (D)<sup>47</sup>.

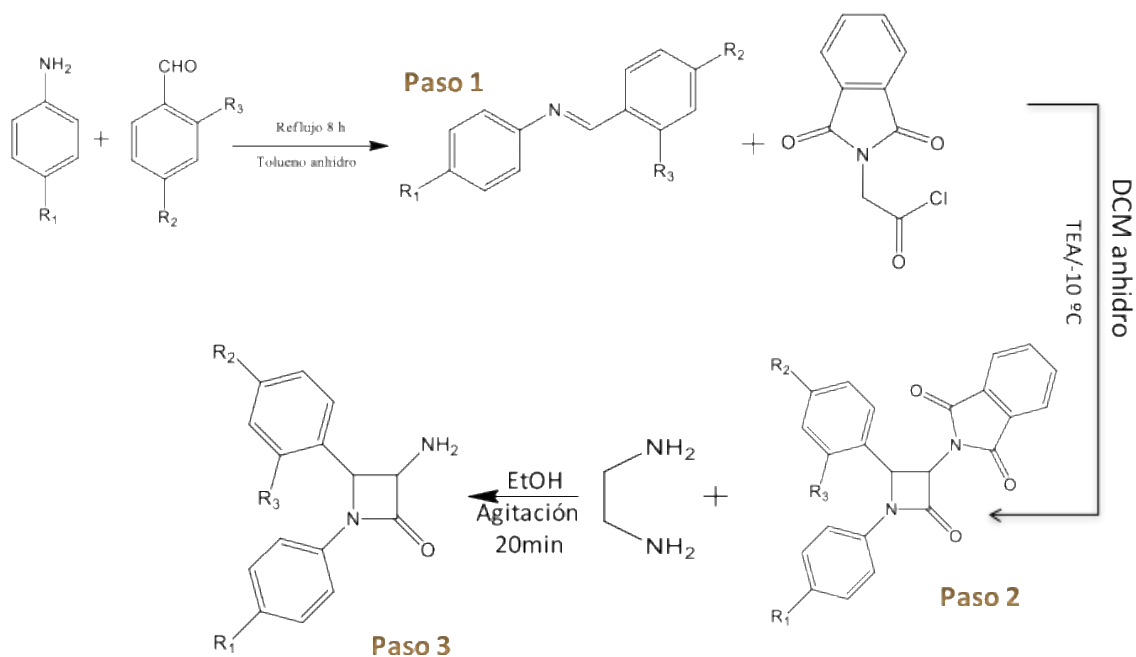
- **Espectroscopía de resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$**

El procedimiento consistió en disolver 10 mg de la muestra sólida en aproximadamente 0.5 mL de dimetilsulfoxido deuterado ( $\text{DMSO } d_6$ ) en un tubo de inyección. Posteriormente se procedió a realizar la lectura en el equipo de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN  $^1\text{H}$ ) Bruker 600 ultrashield <sup>TM</sup> 600 MHz de la UTPA. En los espectros obtenidos se logra observar señales de los protones de la molécula en forma de singulete (S), doblete (D), triplete (T) y multiplete (M). El desplazamiento químico se expresa en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento en Hertz (Hz)<sup>48</sup>.

## 2.2. METODOLOGÍA

### 2.2.1. Ruta de síntesis de los derivados de 3-amino-azetidin-2-ona

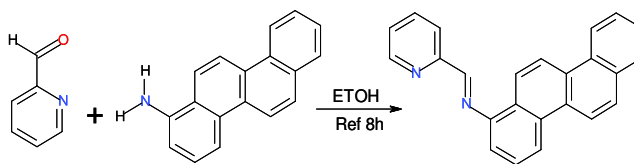
Para la síntesis de los compuestos derivados de 3-amino-azetidin-2-ona, se estableció una ruta de síntesis química (Figura 7), en donde, a partir de la síntesis de doce iminas aromáticas se obtienen 12 compuestos derivados de azetidin-2-ona en una configuración *cis* y otros 12 compuestos derivados de azetidin-2-ona en configuración *trans*. Posteriormente se llevó la reacción de desprotección de las azetidin-2-onas para la obtención de derivados de 3-amino-azetidin-2-ona<sup>49</sup>.



**Figura 7.** Ruta de síntesis química de derivados de 3-amino-azetidin-2-onas.

### 2.2.2. Síntesis y caracterización de derivados de iminas aromáticas

En un matraz bola de 100 mL se agregaron 10 mmol de *p*-Anisidina en 60 mL de tolueno más 10 mmol de un benzaldehído y se coloca a reflujo constante durante 8 horas. Al término de la reacción, ésta es comprobada por CCF. Al compuesto obtenido se le realiza un lavado con *n*-Hexano, obteniendo como producto una imina aromática. Este procedimiento fue similar para las iminas poliaromáticas. Los productos se identifican por técnicas espectrométricas como Espectroscopía de Infrarrojo (Figura 8)<sup>50</sup>.

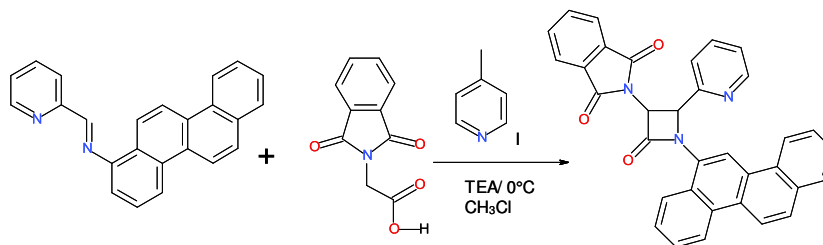


**Figura 8.** Síntesis de iminas aromáticas a través de la reacción de ceto-amina

### 2.2.3. Síntesis y caracterización de derivados de 3-ftalimida-azetidín-2-ona

Para la obtención de azetidín-2-onas, se utilizaron las condiciones de reacción de Staudinger. En un matraz bola de 100 mL se agregaron 1.1 mmol del cloruro ácido más 10 mL de trietilamina anhidra (TEA) en 60 mL de diclorometano (DCM) anhidro, la reacción se colocó en enfriamiento a una temperatura de -10°C en un baño de hielo y sal, después se agregaron 10 mmol de una imina aromática (producto anterior) gota a gota y se dejó en agitación durante una hora, posteriormente se dejó en agitación constante a temperatura ambiente (TA) durante 24 h, al término de la reacción se comprobó la identidad del producto por CCF y se purificó por cromatografía en columna (Figura 9). Las azetidín-2-onas fueron caracterizadas por técnicas espectrométricas de IR, RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C<sup>51</sup>.

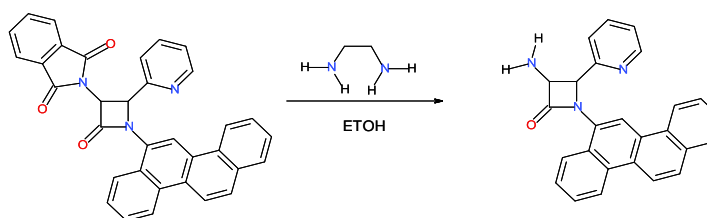




**Figura 9.** Síntesis de ftalamida-azetidin-2-onas a través de la reacción de Staudinger

#### 2.2.4. Síntesis y caracterización de derivados de 3-amino-azetidin-2-onas

En un matraz bola de 25 mL se adicionó 1 mmol de azetidin-2-ona (producto anterior) en 8 mL de etanol anhidro, posteriormente se agregó 1 mL de Etilendiamina y se realizó una extracción con  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$  y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . El compuesto obtenido se purificó por cromatografía en columna (Figura 10). Las 3-amino-azetidin-2-onas fueron caracterizadas por técnicas espectrométricas de IR, RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $\text{C}^{13}$  <sup>45</sup>.



**Figura 10.** Reacción de desprotección de grupo amino de la azetidin-2-ona

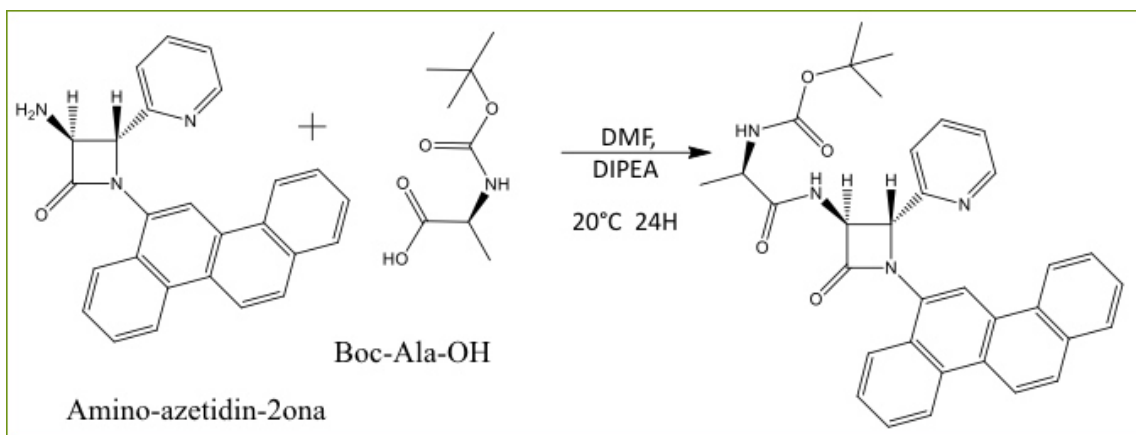
## 2.3. ESTRATEGIAS DE CONJUGACIÓN DEL COMPLEJO ANTICUERPO-

### FÁRMACO

#### 2.3.1. Unión del compuesto azetidin-2-ona al enlazador

##### Reacción de la Boc-alanina

A una disolución de Boc-Ala-OH (300 mg, 1.5 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (10 ml) se le adicionó la azetidin-2-ona (F-12-3t) correspondiente (2.0 mmol), HOBt (1-hidroxibenzotriazol) (2.05 mmol) y TEA anhidra (2.0 mmol). Tras una noche de agitación a temperatura ambiente se evaporó el disolvente, y el residuo resultante se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  (10%) y disolución saturada de  $\text{NaCl}$ <sup>52</sup>. La fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (Figura 11).

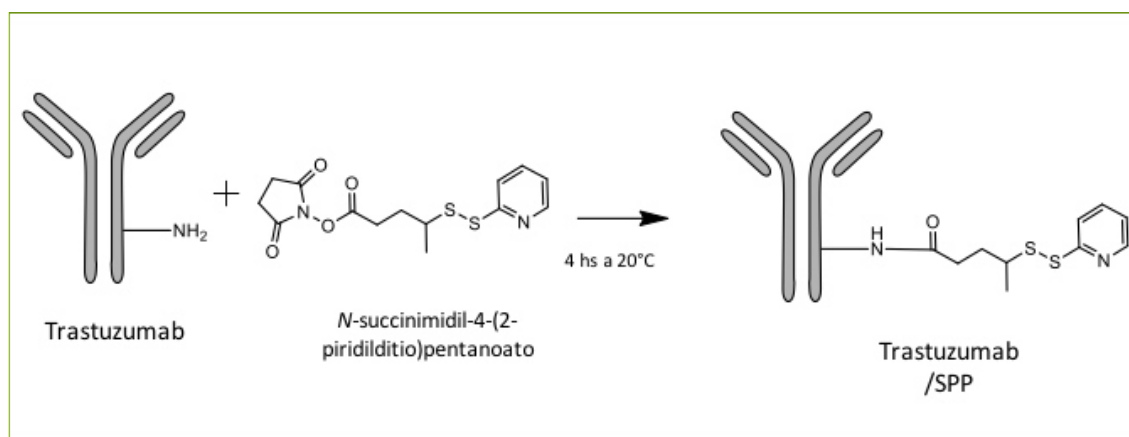


**Figura 11.** Reacción con la Boc-alanina

##### Reaccion del anticuerpo con SPP

El anticuerpo monoclonal anti-Her-2 se hizo reaccionar con el reactivo SPP [*N*-succinimidil-4-(2-piridiltio) pentanoato] (1: 0.5 Mol, 10  $\mu\text{M}$ ), durante 4 h a una

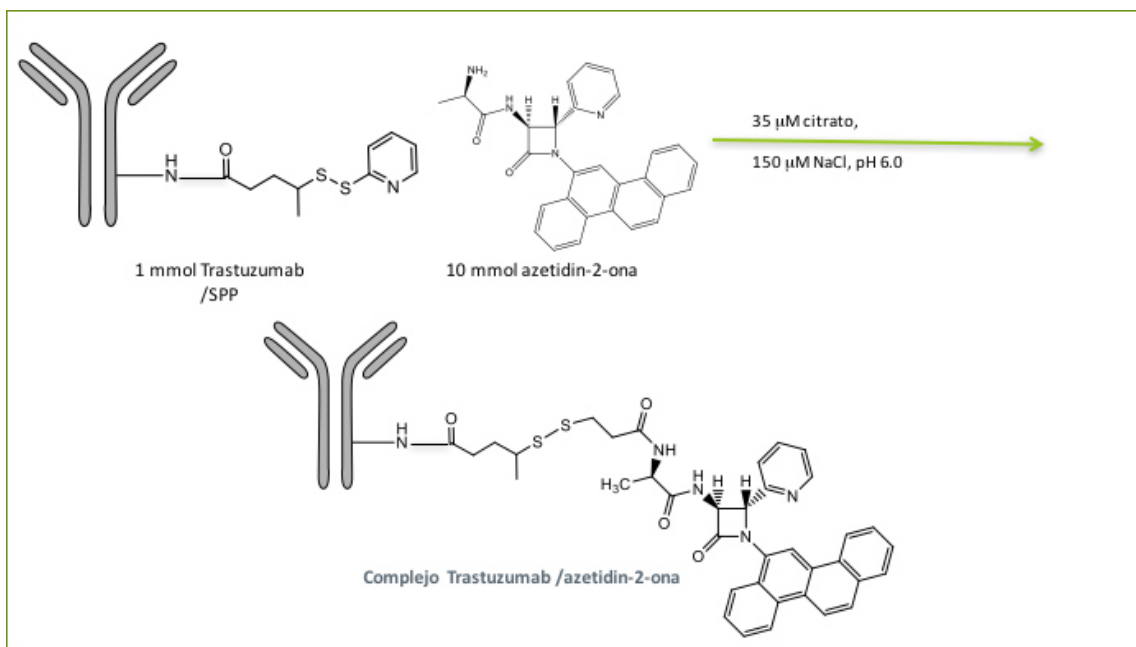
temperatura de 20°C; amortiguado el pH 6.0 con una solución de 35 mM de citrato, y 150 de mM NaCl <sup>53</sup>.



**Figura 12.** Reacción de Trastuzumab con SPP

### Reacción del ácido dithiopropiónico

Posteriormente se adicionaron los reactivos ácido dithiodipropiónico, PyBOP [(benzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidino)fosfonio], HOBt (1-hidroxibenzotriazol), DIPEA (*N,N*-diisopropiletilamina), DMF (*N,N*-dimetilformamida) a una temperatura de 20°C, además se agregó el reactivo DTT (ditiotreitol), EDTA, en buffer de fosfatos pH 7.5, EtOAc y MeOH, 20°C. El anticuerpo monoclonal anti-Her-2 más el compuesto derivado de azetidin-2-ona (1:4 o 1:10 molar) en reacción durante 24 h a una temperatura de 20°C; esto produce un complejo de anticuerpo-fármaco (Figura 13)<sup>54</sup>.



**Figura 13.** Reacción con el ácido dithiodipropiónico

### 2.3.2. Identificación de complejo Trastuzumab/azetidin-2-ona

Después de la síntesis, y del tratamiento de fusión entre el anticuerpo y el compuesto derivado de azetidin-2-ona (F-12-5t), Se enviara una pequeña muestra (aproximadamente 500  $\mu\text{l}$ ) con una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para la cuantificación y caracterización a través de espectrometría de masas<sup>55</sup>.

## **2.4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO***

### **2.4.1. Determinación de la actividad anticancerígena y citotóxica**

Las líneas celulares cancerígenas SiHa, B16F10 y K562, además de una línea celular no cancerígena (Chang) fueron utilizadas en ensayos independientes cada una para determinar la actividad antineoplásica y hepatotóxica del complejo anticuerpo/azetidin-2-ona así mismo los compuestos derivados de 3-amino azetidin-2-ona sin conjugar. Las células fueron disociadas con tripsina-EDTA, posteriormente se resuspendieron en un medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y se colocaron aproximadamente 5,000 células por pozo en una placa de reacción. Se incubaron las células 24 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y posteriormente se añadieron 100 µL de la concentración deseada del complejo azetidin-2-ona/anticuerpo. Enseguida se incubaron 48 h a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> para después añadir 50 µL del reactivo WST-1 [2-(4 yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio] e incubar por 2 horas para finalmente medir la densidad óptica a 450 nm con un lector para ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Con el valor de la viabilidad celular se calculó la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de las muestras en estudio y el control positivo (Colchicina) con la cual se puede comparar y concluir si presenta la actividad anticancerígena <sup>56, 57</sup>.

### **2.4.2. Determinación de la apoptosis por la técnica de caspasa-3**

A partir de un cultivo de la línea celular B16F10 fueron disociadas en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 10% de SFB en placas de poliestireno de 12

pozos a una densidad celular de aproximadamente  $3-5 \times 10^6$  células por mililitro. Posteriormente, se incubaron las células durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  y se añadieron  $100 \mu\text{L}$  con la  $\text{CI}_{50}$  del complejo azetidin-2-ona/anticuerpo, así como de los controles. Después se incubaron por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera al 5% de  $\text{CO}_2$ . A continuación, se resuspendieron las células y se añadieron  $50 \mu\text{L}$  de reactivo de lisis celular que contiene  $1.5 \mu\text{M}$ , se incubó durante 10 minutos en hielo, y se centrifugó y transfirió el sobrenadante (fracción citoplasmática) a un tubo nuevo. Se diluyó dicha fracción a una concentración de  $50-200 \mu\text{g}$  por cada  $50 \mu\text{L}$  de reactivo de lisis celular.

Se añadieron  $50 \mu\text{L}$  de buffer de reacción 2X y  $5 \mu\text{L}$  del tetrapéptido *p*-nitroanilina DEVD (DEVD-pNA). Se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 horas (en oscuridad) y finalmente se midió la densidad óptica a  $405 \text{ nm}$  con un lector ELISA. Con dicho valor se determinó la actividad de apoptosis del anticuerpo/azetin-2-ona mediante el cálculo del porcentaje de muerte determinado con los valores del control positivo (podofilotoxina), considerado como un 100% de muerte por apoptosis<sup>58</sup>.

#### **2.4.3. Ensayo *in vivo* de la sensibilidad a los fármacos en un modelo murino**

Este estudio se realizó en grupos de cuatro ratones de la cepa C57BL/6 con una edad de entre siete a ocho semanas de edad, cada grupo se homogenizó a un mismo peso, edad, y sexo, a los cuales se les administró una sola inyección intraperitonealmente de  $5 \times 10^6$  células B16F10 en suspensión en  $100 \mu\text{L}$  de medio de cultivo celular (MEM suplementado con 7,5% de FBS). El complejo azetidin-2-ona/anticuerpo ( $10 \mu\text{g/kg}$ ) y azetidin-2-ona como control ( $10 \mu\text{g/kg}$ ), fue administrado por vía intravenosa en dosis única al día quince después del desarrollo de los tumores. La dosificación se formuló a

---

partir del  $CI_{50}$  presentado en la línea celular B16F10 quedando como una dosis de 10  $\mu\text{g/kg}$  de peso del animal. El crecimiento del tumor, así como su regresión posterior al tratamiento, se estimó mediante la determinación del aumento diario del peso del animal y la comparación entre el peso y tamaño de los tumores de los diferentes grupos experimentales al deceso del animal<sup>59</sup>. Todos los animales fueron tratados de acuerdo a la norma establecida para el manejo, cuidado y disposición de animales de experimentación **NOM-062-ZOO-1999** <sup>60</sup>.

---

## 2.5. SEGURIDAD EN EL LABORATORIO Y DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS

Se manejaron residuos tanto químicos como biológicos, los cuales se dispusieron en diversos contenedores como:

**A.** Soluciones salinas pH 6.8, soluciones de: sales inorgánicas, ácidos inorgánicos, orgánicos y bases inorgánicas.

**D.** Tóxicos inflamables, combinaciones orgánicas halogenadas líquidas, bases orgánicas y aminas.

**E.** Muy tóxico, cancerígeno orgánico.

**Contenedor rojo.** Residuos punzocortantes biológico-infecciosos.

**Contenedor amarillo.** Residuos de órganos, tejidos, célula biológico-infecciosa.

Todos ellos se encuentran estratégicamente ubicados en el laboratorio de uso. Al final, el material biológico restante y físico reusable se esterilizó mediante calor húmedo.

Los experimentos *in vivo* se llevaron a cabo bajo los estatutos de la Norma Oficial Mexicana **NOM-062-ZOO-1999**<sup>57</sup>, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.



---

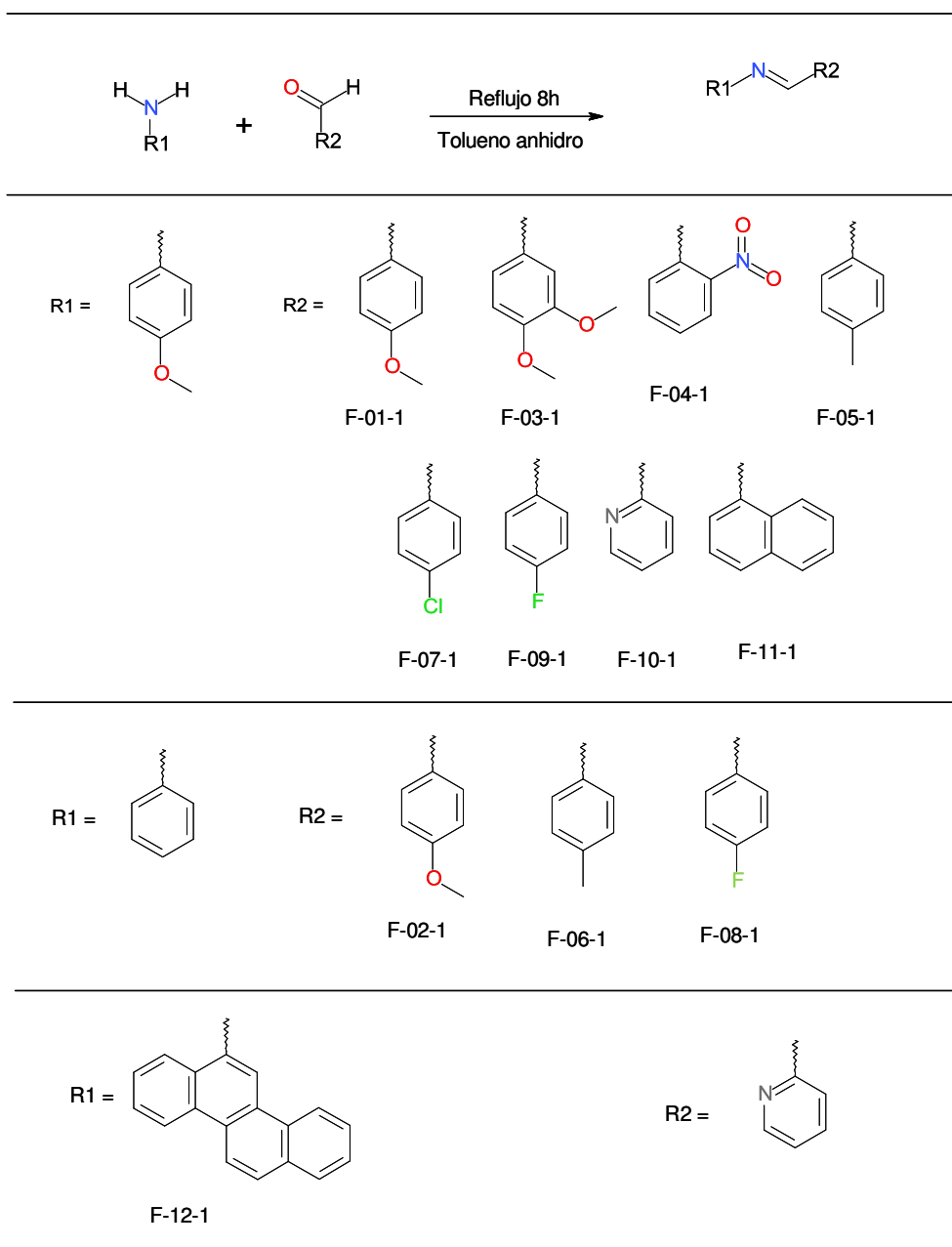
## CAPÍTULO 3

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

##### 3.1.1. Síntesis de derivados de iminas aromáticas

Para la formación de una imina aromática se realizó mediante la reacción de adición cetona-amina, en la que se requiere una amina primaria y un aldehído<sup>61</sup>. A partir de este método de síntesis y con los reactivos mostrados en la figura 16, se obtuvieron los 10 derivados de iminas aromáticas y 2 poliaromáticas a partir de la 4-metoxi-anilina, anilina y 8 diferentes aldehídos.



**Figura 14.** Diferentes sustituyentes de los compuestos derivados de iminas aromáticas

Los doce compuestos derivados de iminas aromáticas obtenidos se muestran en la tabla 2, registrando rendimientos entre 56 y 93 % que se encuentran en 66% arriba de este valor.

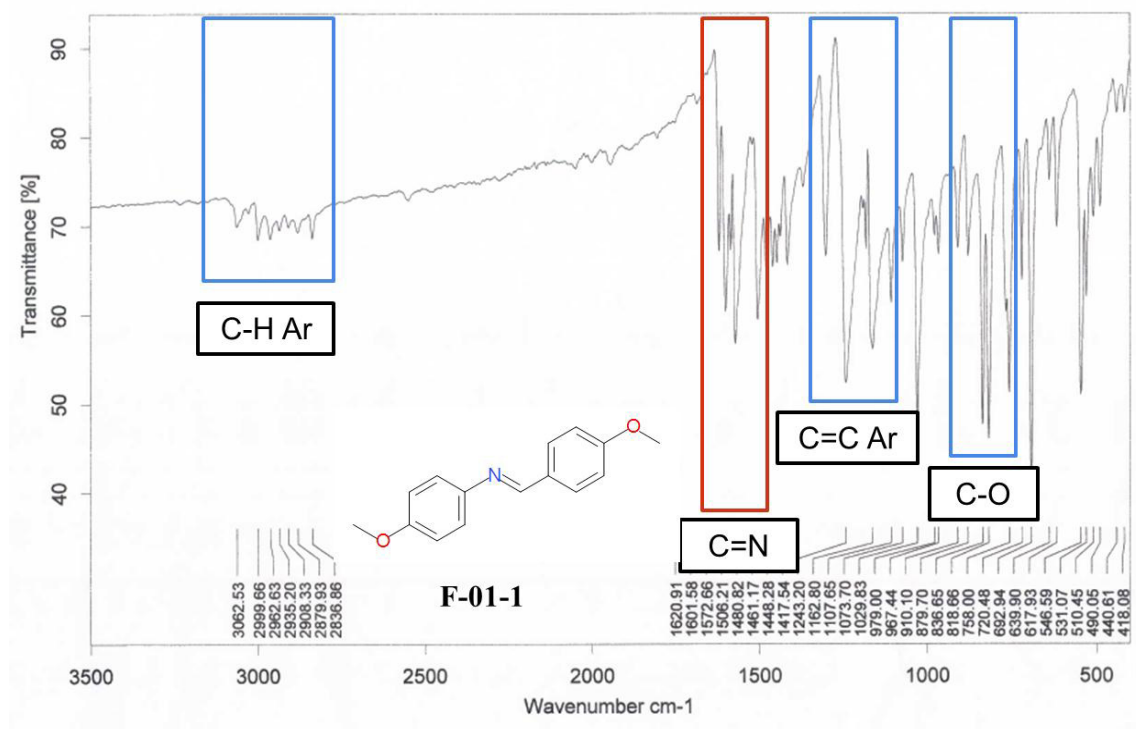
**Tabla 2.** Iminas aromáticas obtenidas a través de la reacción de adición cetona-amina

ID	Nombre químico	Punto de fusión	Peso molecular	Porcentaje de rendimiento
<b>F-01-1</b>	<i>N</i> ,1-(4-metoxifenil)metanimina	56-58°C	211 g/mol	93.0%
<b>F-02-1</b>	1-(4-metoxifenil)- <i>N</i> -fenil-metanimina	144-146°C	241 g/mol	95.0%
<b>F-03-1</b>	1-(3,4-dimetoxifenil)- <i>N</i> -(4-metoxifenil)metanimina	134-136°C	271 g/mol	92.0%
<b>F-04-1</b>	<i>N</i> -(4-metoxifenil)-1-(2-nitrofenil)metanimina	78-80°C	256 g/mol	90.0%
<b>F-05-1</b>	<i>N</i> -(4-metoxifenil)-1-( <i>p</i> -tolil)metanimina	82-84°C	225 g/mol	63.0%
<b>F-06-1</b>	<i>N</i> -fenil-1-( <i>p</i> -tolil)metanimina	42-44°C	195 g/mol	92.0%
<b>F-07-1</b>	1-(4-clorofenil)- <i>N</i> -(4-metoxifenil)metanimina	118-120°C	245 g/mol	91.0%
<b>F-08-1</b>	1-(4-fluorofenil)- <i>N</i> -fenil-metanimina	40-42°C	199 g/mol	93.0%
<b>F-09-1</b>	1-(4-fluorofenil)- <i>N</i> -(4-metoxifenil)metanimina	96-98°C	229 g/mol	89.0%
<b>F-10-1</b>	<i>N</i> -(4-metoxifenil)-1-(2-piridil)metanimina	34-36°C	212 g/mol	56.0%
<b>F-11-1</b>	<i>N</i> -(4-metoxifenil)-1-(1-naftil)metanimina	62-64°C	261 g/mol	87.0%
<b>F-12-1</b>	<i>N</i> -criseno-1-il-1-(2-pyridil)metanimina	182-184°C	332 g/mol	93.0%

### Espectrometría de infrarrojo de la imina aromática F-01-1

En la figura 16 se presenta el análisis por espectroscopía de infrarrojo del compuesto F-01-1, donde se pueden observar las principales bandas de absorción que pertenecen a los enlaces que se encuentran en la molécula, siendo las bandas más

significativas: el enlace carbono-hidrógeno aromático (C-H Ar) en la región de 2957  $\text{cm}^{-1}$  con una intensidad débil; el enlace imina (C=N) se encuentra en una región de 1600  $\text{cm}^{-1}$  con una intensidad fuerte (el cual se señala en color rojo), además las bandas de los enlaces del carbonilo (C=O) se presentan en una región de 1100  $\text{cm}^{-1}$  con una intensidad fuerte. Cabe destacar que no se encuentran en el espectro de infrarrojo bandas pertenecientes de las aminas y carbonilos.



**Figura 15.** Espectro de infrarrojo del compuesto F-01-1

Los espectros de infrarrojo del resto de los compuestos derivados de iminas aromáticas se presentan en la sección de anexos. En la tabla 3, se presentan las principales bandas de los enlaces pertenecientes a cada estructura mencionada.

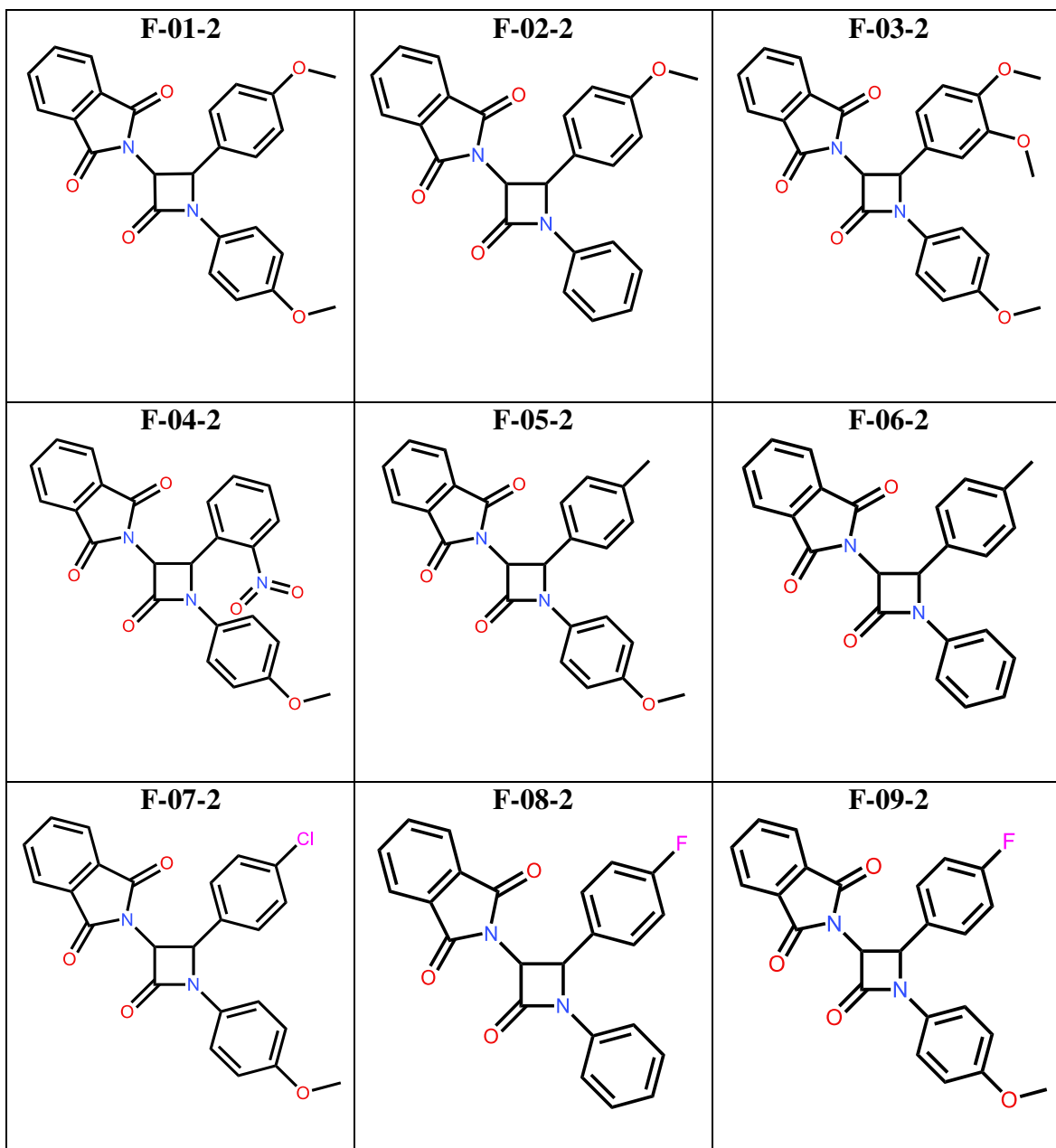
**Tabla 3.** Principales bandas en los espectros de infrarrojo de las iminas aromáticas

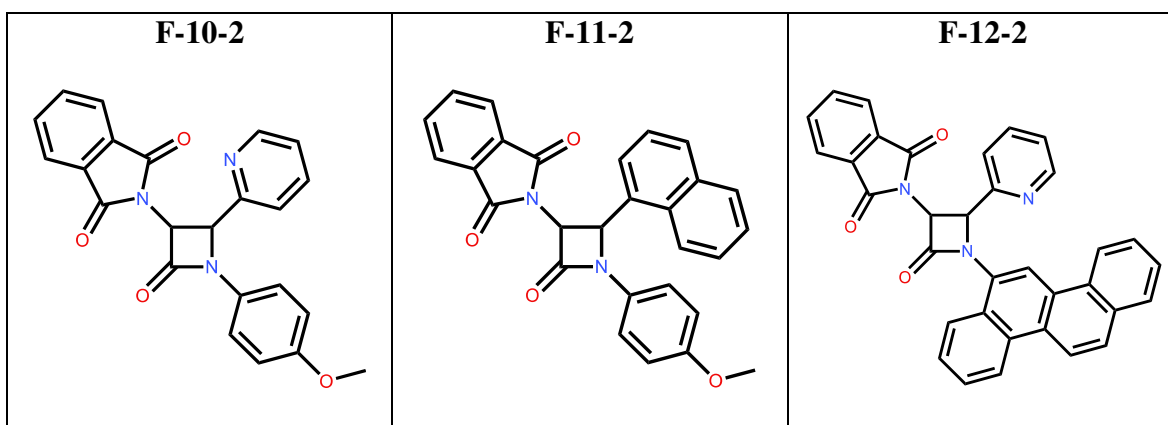
ID	C-H	C=N	C-C	C-O
F-01-1	3062 cm <sup>-1</sup>	1600 cm <sup>-1</sup>	1243 cm <sup>-1</sup>	692 cm <sup>-1</sup>
F-02-1	2956 cm <sup>-1</sup>	1602 cm <sup>-1</sup>	1288 cm <sup>-1</sup>	833 cm <sup>-1</sup>
F-03-1	3009 cm <sup>-1</sup>	1599 cm <sup>-1</sup>	1272 cm <sup>-1</sup>	863 cm <sup>-1</sup>
F-04-1	3013 cm <sup>-1</sup>	1617 cm <sup>-1</sup>	1246 cm <sup>-1</sup>	860 cm <sup>-1</sup>
F-05-1	2996 cm <sup>-1</sup>	1603 cm <sup>-1</sup>	1236 cm <sup>-1</sup>	834 cm <sup>-1</sup>
F-06-1	3079 cm <sup>-1</sup>	1607 cm <sup>-1</sup>	1190 cm <sup>-1</sup>	876 cm <sup>-1</sup>
F-07-1	3008 cm <sup>-1</sup>	1618 cm <sup>-1</sup>	1290 cm <sup>-1</sup>	835 cm <sup>-1</sup>
F-08-1	3063 cm <sup>-1</sup>	1623 cm <sup>-1</sup>	1214 cm <sup>-1</sup>	831 cm <sup>-1</sup>
F-09-1	3015 cm <sup>-1</sup>	1621 cm <sup>-1</sup>	1145 cm <sup>-1</sup>	840 cm <sup>-1</sup>
F-10-1	3048 cm <sup>-1</sup>	1624 cm <sup>-1</sup>	1241 cm <sup>-1</sup>	829 cm <sup>-1</sup>
F-11-1	3042 cm <sup>-1</sup>	1608 cm <sup>-1</sup>	1242 cm <sup>-1</sup>	771 cm <sup>-1</sup>
F-12-1	3011 cm <sup>-1</sup>	1624 cm <sup>-1</sup>	1289 cm <sup>-1</sup>	821 cm <sup>-1</sup>

### 3.1.2. Síntesis de derivados de ftalamida-azetidin-2-onas

En la síntesis de las ftalamidas-azetidin-2-onas se utilizaron las condiciones de reacción de Staudinger<sup>62</sup>. Los compuestos obtenidos anteriormente (iminas aromáticas) fueron utilizados como reactivo de partida en esta reacción. Al comienzo de la reacción de Staudinger, ocurre un ataque nucleofílico del grupo imino sobre el cloruro ácido (Reactivo de Mukaiyama)<sup>63</sup> provocando un reacomodo de electrones y un desplazamiento del grupo carboxilo para la formación de un enolato, que trae consigo una aproximación entre los carbonos adyacentes de la reacción para dar así una cicloadición y la formación de un anillo β-lactámico (azetidin-2-ona). A través de esta

ruta de síntesis se obtuvieron diferentes derivados de azetidín-2-ona en orientaciones isoméricas *trans* y *cis*<sup>64</sup>, como se muestra en la Figura 17.





**Figura 16.** Compuestos obtenidos en una mezcla racémica (*cis* y *trans*)

Cabe destacar que los compuestos fueron confirmados por técnicas espectrofotométricas. En la tabla 4, se presentan los rendimientos de los compuestos derivados de ftalamida-azetidin-2-ona en una configuración *trans*, donde los rendimientos finales oscilan entre un 20.6 y un 47.5 por ciento, pero en el caso de los compuestos F-08-2t y F-12-2t fueron preferentemente en configuración *trans*, también se presenta en esta tabla su Log P<sup>65</sup>.

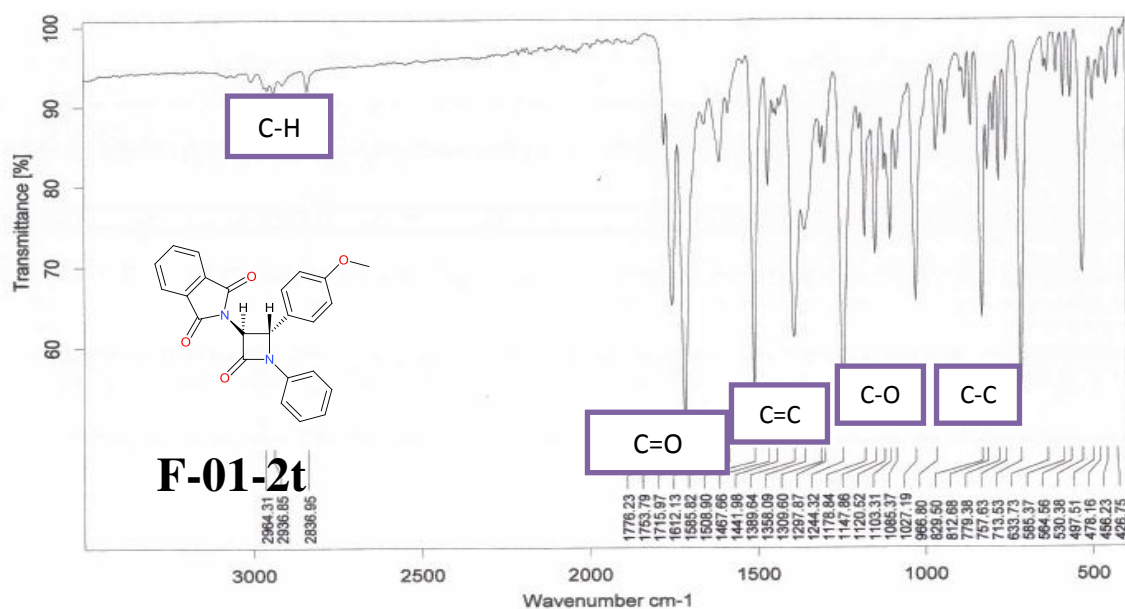
**Tabla 4.** Compuestos derivados de ftalamida-azetidin-2-ona en configuración *trans*

ID	Porcentaje de rendimiento	Log P	Infrarrojo	RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>13</sup> C
F-01-2t	21.1 %	3.11	*	*	*
F-02-2t	21.6 %	3.24	*	*	*
F-03-2t	20.6 %	2.98	*	*	*
F-04-2t	38.0 %	3.27	*	*	*
F-05-2t	47.5 %	3.72	*	*	*
F-06-2t	29.4 %	3.85	*	*	*
F-07-2t	33.4 %	3.79	*	*	*

<b>F-08-2t</b>	85.2 %	3.52	*	*	*
<b>F-09-2t</b>	30.1 %	3.39	*	*	*
<b>F-10-2t</b>	40.0 %	2.32	*	*	*
<b>F-11-2t</b>	93.2 %	4.23	*	*	*
<b>F-12-2t</b>	90.0 %	5.44	*	*	*

### Espectrometría de infrarrojo del compuesto F-01-2t

En el espectro de infrarrojo del compuesto F-01-2t se pueden detectar las vibraciones de los enlaces característicos; carbono-hidrógeno aromático (C-H) en 3100-2900  $\text{cm}^{-1}$ , carbonilo (C=O) en 1700-1800  $\text{cm}^{-1}$ , carbono-carbono doble enlace (C=C) en 1500  $\text{cm}^{-1}$ . Además, la desaparición de la banda de imina en 1650  $\text{cm}^{-1}$  predice la formación de compuestos derivados de ftalamida-azetidin-2-ona (Figura 18) <sup>66</sup>.



**Figura 17.** Espectro de infrarrojo del compuesto F-01-2t



El resto de los espectros de infrarrojo son mostrados en la sección de anexos, en la tabla 5 se muestran las bandas características de cada uno de los compuestos en análisis.

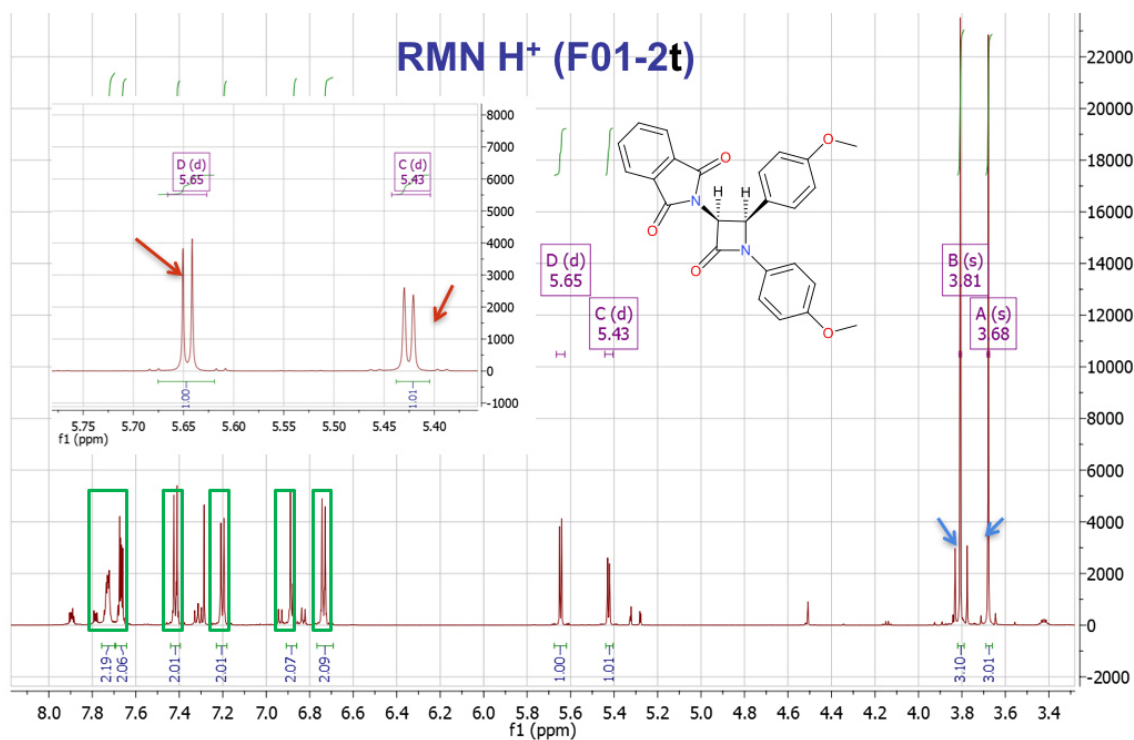
**Tabla 5.** Principales bandas en los espectros de infrarrojo de los derivados de ftalamida-azetidin-2-ona en configuración *trans*

ID	C-H	C=O	C=O	C=C	C-O	C-C
F-01-2t	2964 cm <sup>-1</sup>	1776 cm <sup>-1</sup>	1753 cm <sup>-1</sup>	1441 cm <sup>-1</sup>	1178 cm <sup>-1</sup>	779 cm <sup>-1</sup>
F-02-2t	2955 cm <sup>-1</sup>	1777 cm <sup>-1</sup>	1753 cm <sup>-1</sup>	1429 cm <sup>-1</sup>	1177 cm <sup>-1</sup>	794 cm <sup>-1</sup>
F-03-2t	2964 cm <sup>-1</sup>	1753 cm <sup>-1</sup>	1716 cm <sup>-1</sup>	1422 cm <sup>-1</sup>	1106 cm <sup>-1</sup>	748 cm <sup>-1</sup>
F-04-2t	2956 cm <sup>-1</sup>	1780 cm <sup>-1</sup>	1748 cm <sup>-1</sup>	1512 cm <sup>-1</sup>	1252 cm <sup>-1</sup>	718 cm <sup>-1</sup>
F-05-2t	3014 cm <sup>-1</sup>	1778 cm <sup>-1</sup>	1753 cm <sup>-1</sup>	1464 cm <sup>-1</sup>	1207 cm <sup>-1</sup>	744 cm <sup>-1</sup>
F-06-2t	2969 cm <sup>-1</sup>	1781 cm <sup>-1</sup>	1753 cm <sup>-1</sup>	1499 cm <sup>-1</sup>	--	746 cm <sup>-1</sup>
F-07-2t	2963 cm <sup>-1</sup>	1777 cm <sup>-1</sup>	1750 cm <sup>-1</sup>	1494 cm <sup>-1</sup>	1246 cm <sup>-1</sup>	770 cm <sup>-1</sup>
F-08-2t	2969 cm <sup>-1</sup>	1752 cm <sup>-1</sup>	1712 cm <sup>-1</sup>	1500 cm <sup>-1</sup>	--	713 cm <sup>-1</sup>
F-09-2t	2953 cm <sup>-1</sup>	1749 cm <sup>-1</sup>	1714 cm <sup>-1</sup>	1484 cm <sup>-1</sup>	1111 cm <sup>-1</sup>	764 cm <sup>-1</sup>
F-10-2t	2935 cm <sup>-1</sup>	1756 cm <sup>-1</sup>	1715 cm <sup>-1</sup>	1480 cm <sup>-1</sup>	1387 cm <sup>-1</sup>	714 cm <sup>-1</sup>
F-11-2t	2933 cm <sup>-1</sup>	1780 cm <sup>-1</sup>	1754 cm <sup>-1</sup>	1508 cm <sup>-1</sup>	1385 cm <sup>-1</sup>	715 cm <sup>-1</sup>
F-12-2t	2953 cm <sup>-1</sup>	1783 cm <sup>-1</sup>	1712 cm <sup>-1</sup>	1506 cm <sup>-1</sup>	--	743 cm <sup>-1</sup>

### Resonancia magnética nuclear de protón del compuesto F-01-2T

En el espectro de RMN de protón se lograron identificar los protones pertenecientes a las estructuras de los derivados de azetidin-2-ona, en la región de 7 a 9 ppm se encuentran los protones pertenecientes a los hidrógenos unidos a anillos aromáticos, en la región de 5-6 ppm se encuentran los protones pertenecientes a los del

anillo de azetidin-2-ona así como su constante de acoplamiento para determinar su posición estructural *trans*, en la región de 3-3.5 ppm se encuentran los protones de los grupos metoxi como lo muestra a continuación la figura 19 <sup>67</sup>.



**Figura 18.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto F-01-2t

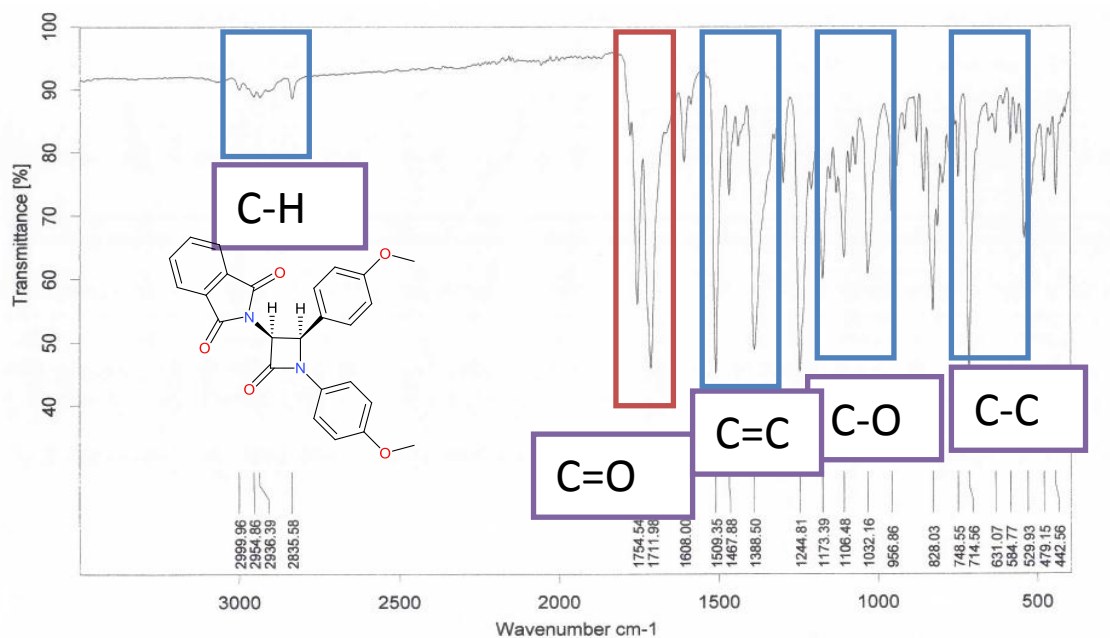
Anteriormente, en la tabla 5 se presentaron los compuestos derivados de ftalamida-azetidin-2-ona, en configuración *trans*. La obtención de los compuestos en configuración *cis* requirió mayor tiempo debido a que se encontraban en muchas ocasiones todavía en mezcla racémica con su isómero en configuración *trans*, como es el caso de los compuestos F-07-3c y F-08-3c que se encuentran impuros. Los compuestos F-11-2c y F-12-2c no se obtienen bajo este proceso de síntesis debido a lo ya reportado por Bandyopadhyay<sup>45</sup>. En la tabla 6 se muestran los resultados de rendimientos de los compuestos en configuración *cis*.

**Tabla 6.** Compuestos derivados de ftalamida-azetidin-2-ona en configuración *cis*

ID	Porcentaje de rendimiento	Log P	Infrarrojo	RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>13</sup> C
<b>F-01-2c</b>	36.0 %	3.11	*	*	*
<b>F-02-2c</b>	50.8 %	3.24	*	*	*
<b>F-03-2c</b>	73.4 %	2.98	*	*	*
<b>F-04-2c</b>	24.0 %	3.27	*	*	*
<b>F-05-2c</b>	13.8 %	3.72	*	*	*
<b>F-06-2c</b>	68.2 %	3.85	*	*	*
<b>F-07-2c</b>	9.3 %	3.79	*	Impuro	Impuro
<b>F-08-2c</b>	11.8 %	3.52	*	Impuro	Impuro
<b>F-09-2c</b>	32.7 %	3.39	*	*	*
<b>F-10-2c</b>	50.7 %	2.32	*	*	*

### **Espectrometría de infrarrojo del compuesto F-01-2c**

En el espectro de infrarrojo se pueden detectar las vibraciones de los enlaces característicos de un carbonilo en la región de 1750-1850 cm<sup>-1</sup>(marcado en color naranja). Aun cuando esta banda de los carbonilos este presente no se puede afirmar que la reacción es terminada, pero si da la pauta para continuar con su caracterización por medio de otros métodos espectrométricos (Figura 20)<sup>63</sup>.



**Figura 19.** Espectro de infrarrojo del compuesto F-01-2c

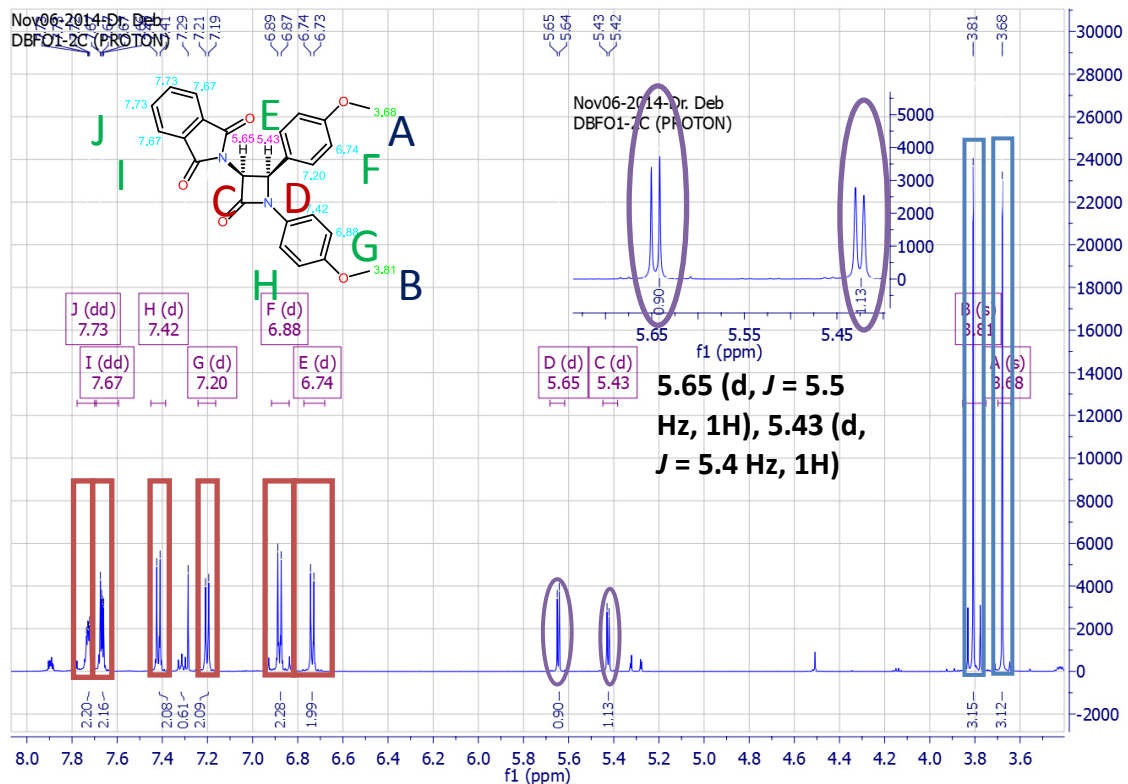
El espectro de infrarrojo del compuesto F-01-2c, presenta las mismas bandas de su isómero *trans*; carbono-hidrógeno aromático (C-H) en 3100-2900 cm<sup>-1</sup> carbonilo (C=O) en 1800-1700 cm<sup>-1</sup>, carbono-carbono doble enlace (C=C) en 1500 cm<sup>-1</sup>, carbono-oxígeno (C-O) en 800-700 cm<sup>-1</sup>. Además, la desaparición de la banda de imina en 1650cm<sup>-1</sup> predice la formación de compuestos derivados de ftalamida-azetidin-2-ona. El resto de los compuestos, son explicados en la tabla 7 <sup>68</sup>.

**Tabla 7.** Principales bandas en los espectros de infrarrojo de los derivados de ftalamido-azetidin-2-ona en configuración *cis*

ID	C-H	C=O	C=O	C=C	C-O	C-c
<b>F-01-2c</b>	2999 cm <sup>-1</sup>	1754 cm <sup>-1</sup>	1711 cm <sup>-1</sup>	1509 cm <sup>-1</sup>	1244 cm <sup>-1</sup>	744 cm <sup>-1</sup>
<b>F-02-2c</b>	2956 cm <sup>-1</sup>	1777 cm <sup>-1</sup>	1753 cm <sup>-1</sup>	1466 cm <sup>-1</sup>	1287 cm <sup>-1</sup>	755 cm <sup>-1</sup>
<b>F-03-2c</b>	2956 cm <sup>-1</sup>	1778 cm <sup>-1</sup>	1749 cm <sup>-1</sup>	1522 cm <sup>-1</sup>	1382 cm <sup>-1</sup>	713 cm <sup>-1</sup>
<b>F-04-2c</b>	2958 cm <sup>-1</sup>	1781 cm <sup>-1</sup>	1749 cm <sup>-1</sup>	1509 cm <sup>-1</sup>	1279 cm <sup>-1</sup>	716 cm <sup>-1</sup>
<b>F-05-2c</b>	2951 cm <sup>-1</sup>	1782 cm <sup>-1</sup>	1753 cm <sup>-1</sup>	1511 cm <sup>-1</sup>	1387 cm <sup>-1</sup>	744 cm <sup>-1</sup>
<b>F-06-2c</b>	2971 cm <sup>-1</sup>	1756 cm <sup>-1</sup>	1714 cm <sup>-1</sup>	1507 cm <sup>-1</sup>	--	793 cm <sup>-1</sup>
<b>F-09-2c</b>	2962 cm <sup>-1</sup>	1754 cm <sup>-1</sup>	1712 cm <sup>-1</sup>	1509 cm <sup>-1</sup>	1387 cm <sup>-1</sup>	763 cm <sup>-1</sup>
<b>F-10-2c</b>	2956 cm <sup>-1</sup>	1780 cm <sup>-1</sup>	1714 cm <sup>-1</sup>	1466 cm <sup>-1</sup>	1387 cm <sup>-1</sup>	743 cm <sup>-1</sup>

### Resonancia magnética nuclear de un protón de F-01-2c

En el espectro de RMN de protón se lograron identificar los protones pertenecientes a las estructuras de los derivados de azetidin-2-ona. En la región de 7 a 9 ppm se encuentran los protones pertenecientes a los hidrógenos unidos a anillos aromáticos, en la región de 5-6 ppm se encuentran los protones pertenecientes a los del anillo de azetidin-2-ona así como su constante de acoplamiento para determinar su posición estructural *cis*, en la región de 3-3.5 ppm se encuentran los protones de los metoxi como se muestra a continuación (Figura 21)<sup>64</sup>.

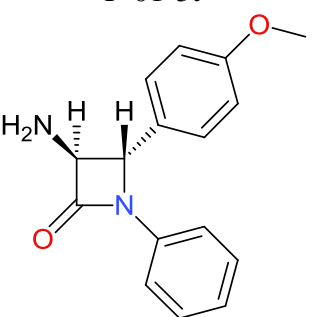
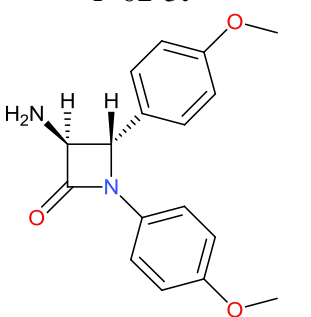
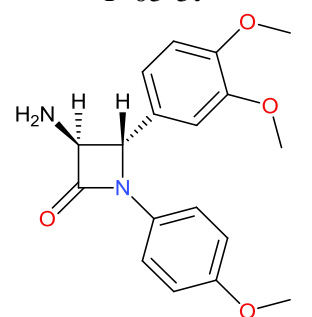
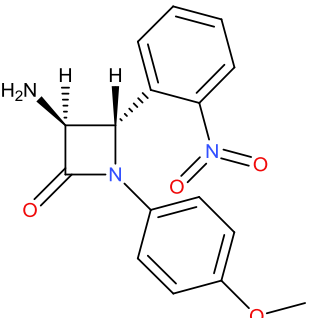
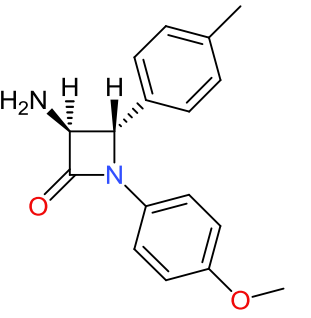
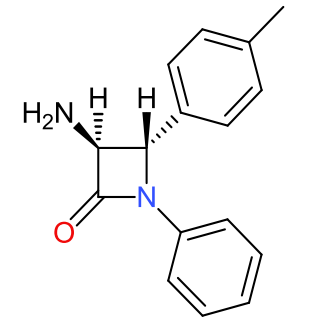
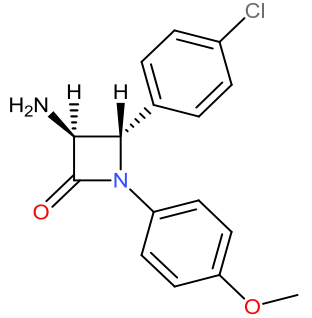
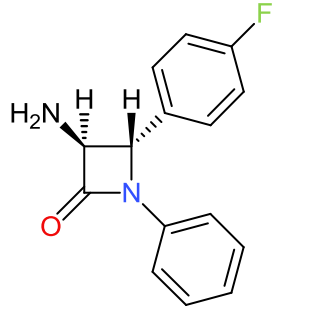
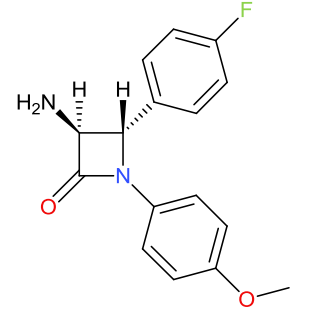
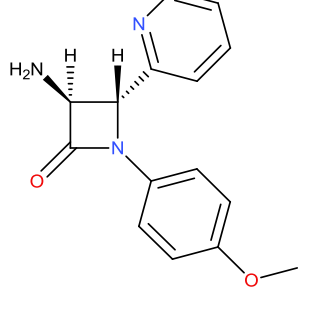
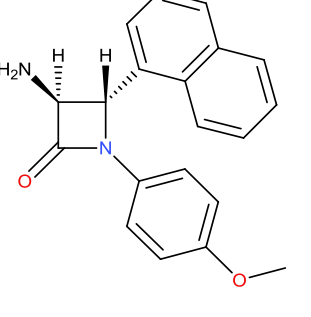
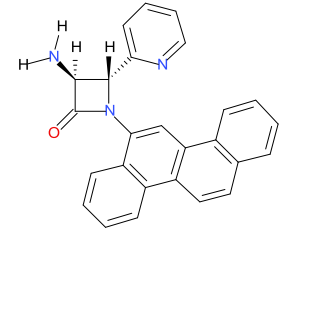


**Figura 20.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto F-01-2c

### 3.1.3. Síntesis de derivados de 3-amino-azetidin-2-onas

Para la obtención de los compuestos derivados de 3-amino-azetidin-2-ona fue necesario trabajar con los compuestos 3-ftalamida-azetidin-2-ona (obtenidos en el paso anterior), la síntesis se realizó por una desprotección del grupo ftalamida, en presencia de un catalizador (etilendiamina) en una solución de etanol, en una atmósfera de Nitrógeno<sup>45</sup>.

Las doce moléculas de 3-amino-azetidin-2-ona en configuración *trans* fueron corridas en una fase móvil 50% Acetato de etilo/ 50% Hexano, posteriormente mediante una purificación en columna de sílice gel, se obtuvo el compuesto planteado. En la figura 22, se muestran las estructuras de los compuestos 3-amino-azetidin-2-ona.

<b>F-01-3t</b> 	<b>F-02-3t</b> 	<b>F-03-3t</b> 
<b>F-04-3t</b> 	<b>F-05-3t</b> 	<b>F-06-3t</b> 
<b>F-07-3t</b> 	<b>F-08-3t</b> 	<b>F-09-3t</b> 
<b>F-10-3t</b> 	<b>F-11-3t</b> 	<b>F-12-3t</b> 

**Figura 21.** Estructuras de los doce compuestos derivados de 3-amino-azetidin-2-ona en configuración *trans*

Los doce compuestos derivados de 3-amino-azetidin-2-ona, fueron obtenidos por la ruta de síntesis planteada. Los porcentajes de rendimiento fueron variados que van desde un 28.8 a un 95 por ciento. En la tabla 8, se presentan los rendimientos y el punto de fusión, así como su peso molecular y log P.

**Tabla 8.** Porcentaje de rendimiento de 3-amino-azetidin-2-onas en configuración *trans*

ID	Porcentaje de rendimiento	Punto de fusión	Log P	Pesos molecular	Infrarrojo	RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>13</sup> C
F-01-3t	71.4 %	96-100°C	1.47	268 g/mol	*	*	*
F-02-3t	72.2 %	100-106°C	1.59	298 g/mol	*	*	*
F-03-3t	93.8 %	92-104°C	1.34	328 g/mol	*	*	*
F-04-3t	28.8 %	185-195°C	1.63	313 g/mol	*	*	*
F-05-3t	95.7 %	100-110°C	2.08	282 g/mol	*	*	*
F-06-3t	62.5 %	125-130°C	2.21	252 g/mol	*	*	*
F-07-3t	54.3 %	89-100°C	2.15	302 g/mol	*	*	*
F-08-3t	88.8 %	92-102°C	1.88	256 g/mol	*	*	*
F-09-3t	55.0 %	98-116°C	1.75	286 g/mol	*	*	*
F-10-3t	60.7 %	114-120°C	0.68	269 g/mol	*	*	*
F-11-3t	77.9 %	152-160°C	2.59	318 g/mol	*	*	*
F-12-3t	55.3 %	150-156°C	3.80	389 g/mol	*	*	*



### Espectrometría de infrarrojo del compuesto F-01-3T

En el espectro de infrarrojo del compuesto F-01-3T (en configuración *trans*) se pueden detectar las vibraciones de los enlaces característicos de un carbonilo en la región de 1750-1850  $\text{cm}^{-1}$ . En el espectro, en una longitud de onda de 3400  $\text{cm}^{-1}$  se detectan los enlaces pertenecientes a la amina en posición tres del anillo de azetidin-2-ona. Cabe destacar que el espectro muestra solamente una banda del enlace carbonilo, a diferencia de su antecesor que mostraba dos bandas (Figura 22)<sup>63</sup>.

Aun cuando, este espectro muestra una gran evidencia del compuesto propuesto con el código F-01-3t, es necesario su análisis por más técnicas espectroscópicas, como se mostrará en la siguiente sección.

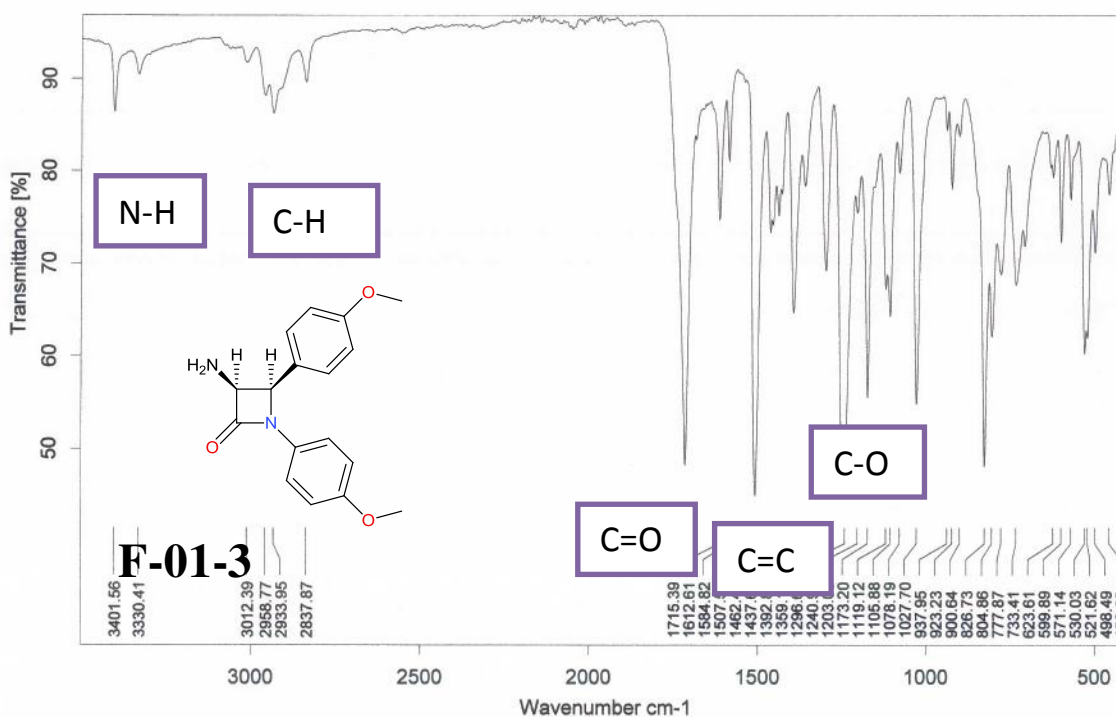


Figura 22. Espectro de infrarrojo del compuesto F-01-3T

El resto de los espectros se encuentran en la sección de anexos, pero a continuación se muestran los análisis de los mismos en la tabla 9, presentando los enlaces principales de cada una de las estructuras y su longitud de onda.

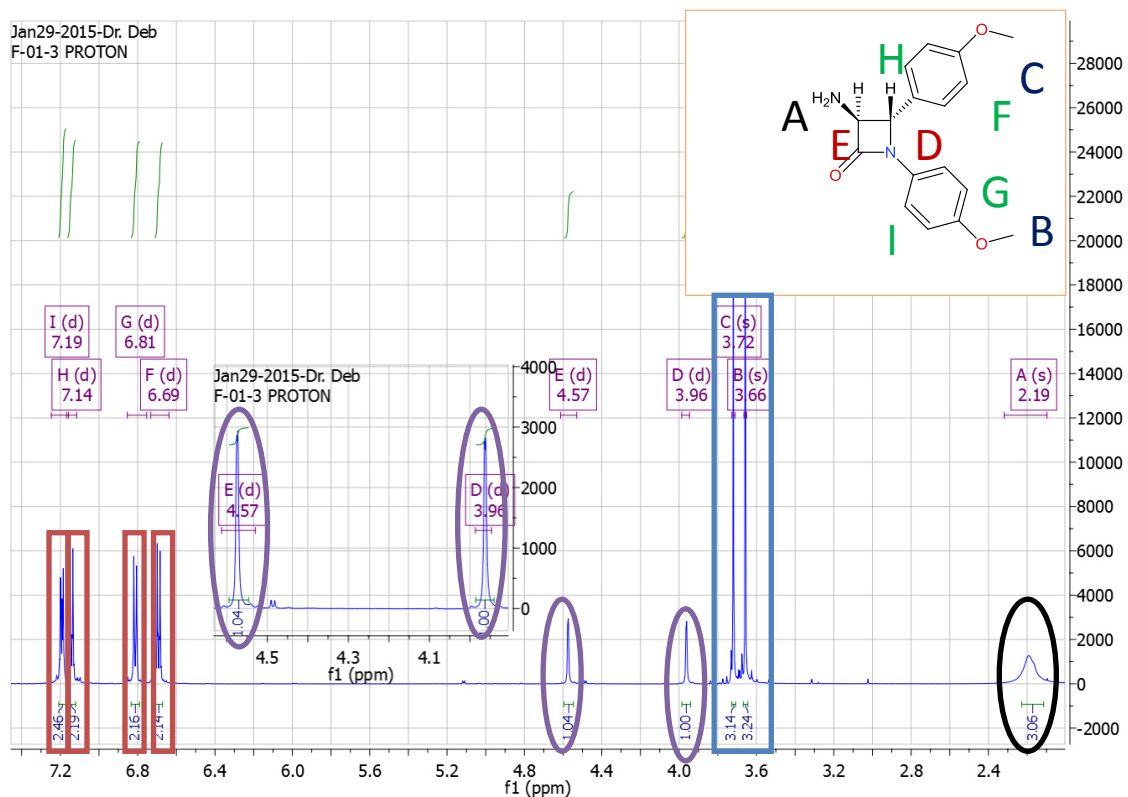
**Tabla 9.** Principales bandas en los espectros de infrarrojo de los derivados 3-amino-azetidin-2-ona en configuración *trans*

ID	N-H	C-H	C=O	C=C	C-O	C-C
<b>F-01-3t</b>	3341 cm <sup>-1</sup>	2953 cm <sup>-1</sup>	1724 cm <sup>-1</sup>	1510 cm <sup>-1</sup>	1245 cm <sup>-1</sup>	823 cm <sup>-1</sup>
<b>F-02-3t</b>	3342 cm <sup>-1</sup>	3065 cm <sup>-1</sup>	1730 cm <sup>-1</sup>	1513 cm <sup>-1</sup>	1249 cm <sup>-1</sup>	747 cm <sup>-1</sup>
<b>F-03-3t</b>	3301 cm <sup>-1</sup>	3001 cm <sup>-1</sup>	1733 cm <sup>-1</sup>	1508 cm <sup>-1</sup>	1237 cm <sup>-1</sup>	877 cm <sup>-1</sup>
<b>F-04-3t</b>	3282 cm <sup>-1</sup>	3064 cm <sup>-1</sup>	1745 cm <sup>-1</sup>	1509 cm <sup>-1</sup>	1243 cm <sup>-1</sup>	860 cm <sup>-1</sup>
<b>F-05-3t</b>	3294 cm <sup>-1</sup>	2952 cm <sup>-1</sup>	1730 cm <sup>-1</sup>	1509 cm <sup>-1</sup>	1242 cm <sup>-1</sup>	824 cm <sup>-1</sup>
<b>F-06-3t</b>	3354 cm <sup>-1</sup>	3028 cm <sup>-1</sup>	1731 cm <sup>-1</sup>	1501 cm <sup>-1</sup>	--	792 cm <sup>-1</sup>
<b>F-07-3t</b>	3292 cm <sup>-1</sup>	3060 cm <sup>-1</sup>	1734 cm <sup>-1</sup>	1498 cm <sup>-1</sup>	1297 cm <sup>-1</sup>	748 cm <sup>-1</sup>
<b>F-08-3t</b>	3283 cm <sup>-1</sup>	2930 cm <sup>-1</sup>	1736 cm <sup>-1</sup>	1509 cm <sup>-1</sup>	--	816 cm <sup>-1</sup>
<b>F-09-3t</b>	3281 cm <sup>-1</sup>	3066 cm <sup>-1</sup>	1728 cm <sup>-1</sup>	1508 cm <sup>-1</sup>	1297 cm <sup>-1</sup>	820 cm <sup>-1</sup>
<b>F-10-3t</b>	3371 cm <sup>-1</sup>	2953 cm <sup>-1</sup>	1729 cm <sup>-1</sup>	1510 cm <sup>-1</sup>	1294 cm <sup>-1</sup>	820 cm <sup>-1</sup>
<b>F-11-3t</b>	3382 cm <sup>-1</sup>	2955 cm <sup>-1</sup>	1736 cm <sup>-1</sup>	1509 cm <sup>-1</sup>	1241 cm <sup>-1</sup>	832 cm <sup>-1</sup>
<b>F-12-3t</b>	3338 cm <sup>-1</sup>	2925 cm <sup>-1</sup>	1738 cm <sup>-1</sup>	1539 cm <sup>-1</sup>	--	754 cm <sup>-1</sup>

### Resonancia magnética nuclear de protón del compuesto F-01-3T

En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto F-01-3t se lograron identificar los protones pertenecientes a las estructuras de los derivados de amino-azetidin-2-ona. En la región de 7 a 9 ppm se encuentra los protones pertenecientes a los hidrógenos unidos a anillos aromáticos, en la región de 5-6 ppm se encuentran los protones pertenecientes al anillo de azetidin-2-ona, en la región de 3-3.5 ppm se encuentran los protones del grupo

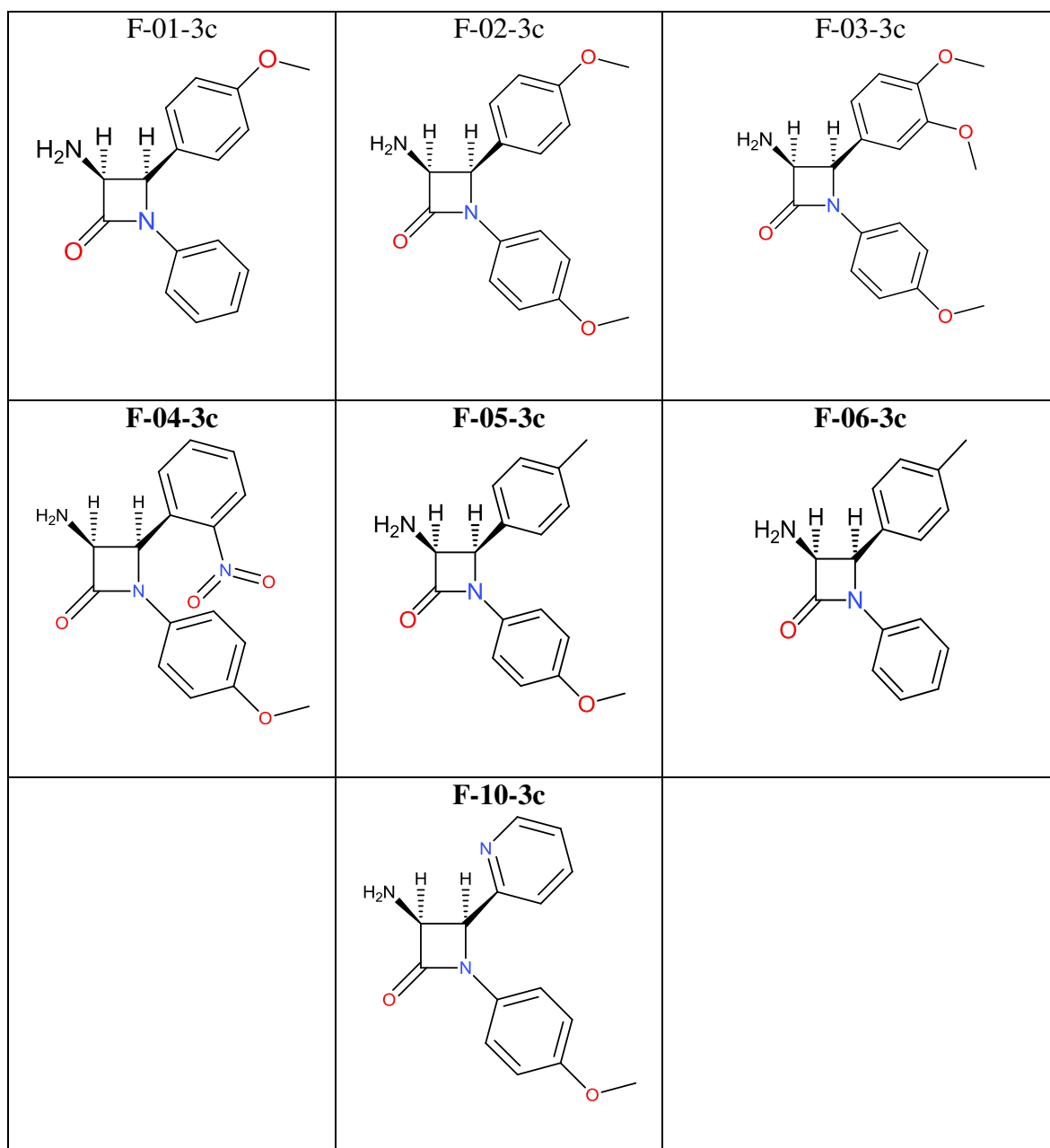
metoxi como se aprecian a continuación en el espectro del compuesto en configuración *trans* (Figura 24)<sup>64</sup>.



**Figura 23.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto F-01-3T

### Derivados de 3-amino-azetidin-2-ona en configuración de *cis*

La síntesis de los *cis*-3-amino-azetidin-2-ona fue monitoreada y confirmada por la técnica de cromatografía en capa fina, en donde a partir del compuesto *cis*-ftalamida-azetidin-2-ona se obtuvieron siete moléculas *cis*-3-amino-azetidin-2-ona las cuales fueron corridas en una fase móvil 50% Acetato de etilo/ 50% Hexano, posteriormente una purificación en columna de sílice gel. En la figura 25, se muestran las estructuras mientras que en la tabla 10 los porcentajes de rendimiento y sus pesos moleculares.



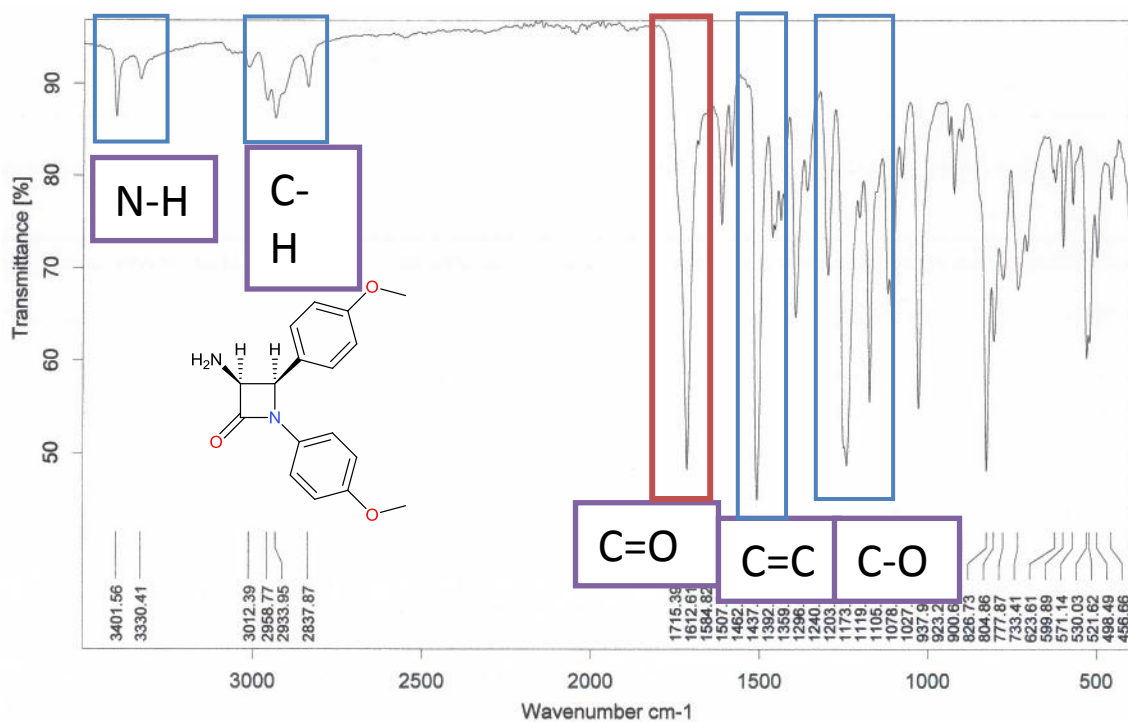
**Figura 24.** Estructuras de los siete compuestos *cis*-3-amino-azetidin-2-ona

**Tabla 10.** Porcentajes de rendimiento de los compuestos *cis*-3-amino-azetidin-2-ona

ID	Porcentaje de rendimiento	Log P	Pesos moleculares	Infrarrojo	RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>13</sup> C
<b>F-01-3c</b>	78.1 %	1.47	268 gr/mol	*	*	*
<b>F-02-3c</b>	88.4 %	1.59	298 gr/mol	*	*	*
<b>F-03-3c</b>	68.5 %	1.34	328 gr/mol	*	*	*
<b>F-04-3c</b>	52.2 %	1.63	313 gr/mol	*	*	*
<b>F-05-3c</b>	80.9 %	2.08	282 gr/mol	*	*	*
<b>F-06-3c</b>	84.2 %	2.21	252 gr/mol	*	*	*
<b>F-10-3c</b>	51.0 %	0.68	269 gr/mol	*	*	*

### Espectrometría de infrarrojo del compuesto F-01-3c

En el espectro de infrarrojo se pueden detectar las vibraciones de los enlaces característicos de una amina en la región de 3200-3400 cm<sup>-1</sup>, la cual es característica de los derivados 3-amino-azetidin-2-ona. Esto se muestra en el siguiente espectro (Figura 26)<sup>63</sup>.



**Figura 25.** Espectro de infrarrojo del compuesto F-01-3c

El resto de los espectros se encuentran en la sección de anexos, pero a continuación se muestran los análisis de los mismos en la tabla 11, presentando los enlaces principales de cada una de las estructuras y su longitud de onda.

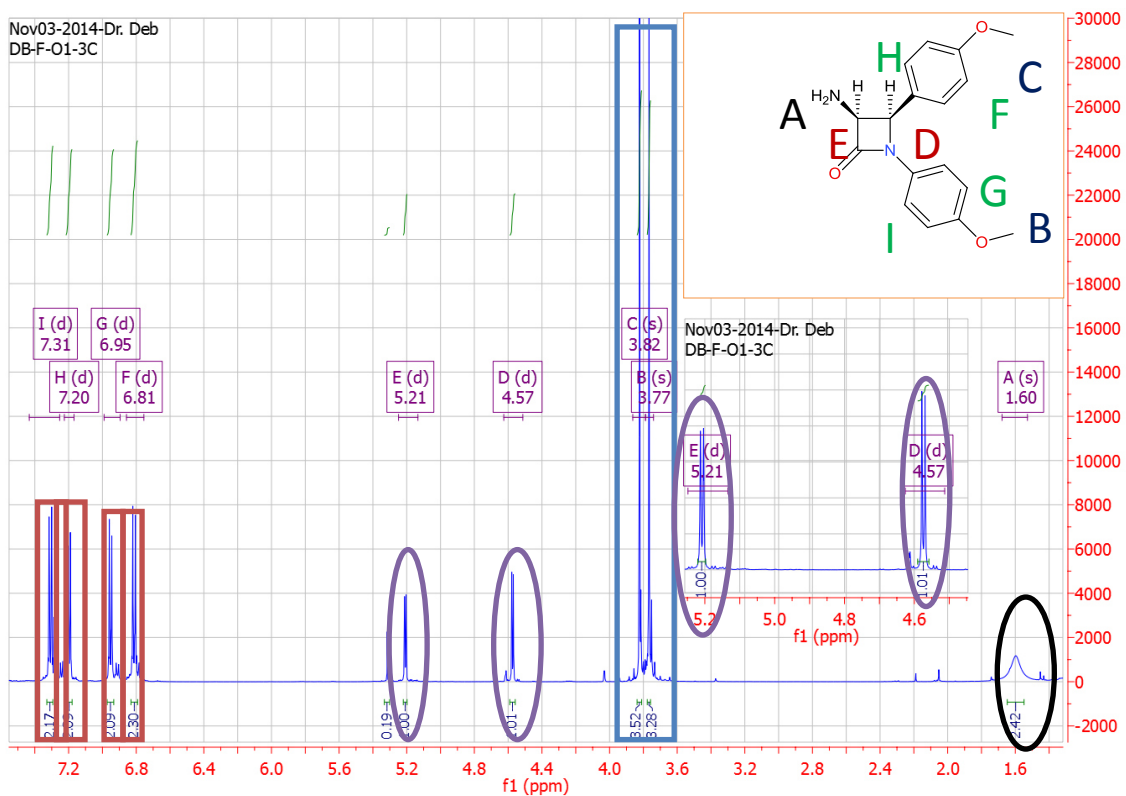
**Tabla 11.** Principales bandas en los espectros de infrarrojo de los derivados 3-aminoazetidin-2-ona en configuración *cis*

ID	N-H	C-H	C=O	C=C	C-O	C-C
<b>F-01-3c</b>	3401 cm <sup>-1</sup>	3012 cm <sup>-1</sup>	1715 cm <sup>-1</sup>	1507 cm <sup>-1</sup>	1246 cm <sup>-1</sup>	826 cm <sup>-1</sup>
<b>F-02-3C</b>	3341 cm <sup>-1</sup>	2928 cm <sup>-1</sup>	1728 cm <sup>-1</sup>	1499 cm <sup>-1</sup>	1248 cm <sup>-1</sup>	746 cm <sup>-1</sup>
<b>F-03-3C</b>	3379 cm <sup>-1</sup>	2956 cm <sup>-1</sup>	1738 cm <sup>-1</sup>	1509 cm <sup>-1</sup>	1237 cm <sup>-1</sup>	828 cm <sup>-1</sup>
<b>F-04-3C</b>	3325 cm <sup>-1</sup>	2952 cm <sup>-1</sup>	1747 cm <sup>-1</sup>	1509 cm <sup>-1</sup>	1248 cm <sup>-1</sup>	822 cm <sup>-1</sup>
<b>F-05-3C</b>	3359 cm <sup>-1</sup>	2924 cm <sup>-1</sup>	1730 cm <sup>-1</sup>	1510 cm <sup>-1</sup>	1245 cm <sup>-1</sup>	823 cm <sup>-1</sup>

<b>F-06-3C</b>	3356 cm <sup>-1</sup>	2925 cm <sup>-1</sup>	1731 cm <sup>-1</sup>	1502 cm <sup>-1</sup>	--	748 cm <sup>-1</sup>
<b>F-10-3C</b>	3373 cm <sup>-1</sup>	2952 cm <sup>-1</sup>	1721 cm <sup>-1</sup>	1509 cm <sup>-1</sup>	1239 cm <sup>-1</sup>	828 cm <sup>-1</sup>

## Resonancia magnética nuclear de protón de F-01-3c

En el espectro de RMN de protón se lograron identificar los protones pertenecientes a las estructuras de los derivados de amino-azetidin-2-ona. En la región de 7 a 9 ppm se encuentran los protones pertenecientes a los hidrógenos unidos a anillos aromáticos, en la región de 5-6 ppm se encuentran los protones pertenecientes a los del anillo de azetidin-2-ona así como su constante de acoplamiento para determinar su posición estructural en *cis*, en la región de 3-3.5 ppm se encuentran los protones de los grupos metoxi como se muestra a continuación (Figura 27)<sup>64</sup>.



**Figura 26.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto F-01-3c en configuración *cis*

## 3.2. ANÁLISIS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR

### 3.2.1. Análisis de acoplamiento molecular de derivados de 3-amino-azetidin-2-ona sobre el sitio activo de la $\beta$ -tubulina

De acuerdo a los antecedentes bibliográficos<sup>69 70 71</sup>, se consideró como blanco receptor de las azetidin-2-onas a la tubulina, específicamente la subunidad beta, por lo que se decidió hacer un análisis de acoplamiento de las moléculas sintetizadas a este receptor. Al no existir una estructura registrada en las bases de datos de la beta tubulina humana, se procedió a diseñar dicha estructura usando como base la tubulina bovina 5CB4.pdb mediante el programa modeller y la secuencia de aminoácidos registrada en el NCBI con la clave NP\_821080.1<sup>72</sup> que se presenta en la figura 28. Los veinticuatro derivados de 3-amino-azetidin-2-ona (ligandos) fueron dibujados en chemdraw<sup>73</sup>, y minimizada la energía en Avogadro<sup>74</sup>, finalmente convertidos a pdbqt en Autodock<sup>75</sup>. La figura 29 muestra la estructura de la  $\beta$ -tubulina humana diseñada.

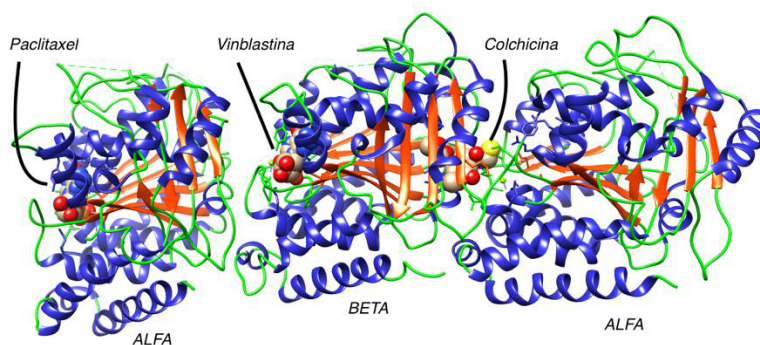
```

1 MREIVHIQAG QCGNQIGAKF WEVISDEHGI DPTGSYHGDS DLQLERINVY YNEATGNKYV
61 PRILVDLEP GTMDSVRSGP FGQIFRPDNF VFGQSGAGNN WAKGHYTEGA ELVDSVLDVV
121 RKESESCDCL QGFQLTHSLG GGTGSGMGTL LISKIREEYP DRIMNTFSVM PSPKVS DTVV
181 EPNATLSVH QLVENTDETY CIDNEALYDI CFRTLKLTTP TYGDLNHLVS ATMSGVTTCL
241 RFPGQLNADL RKLAVNMVPF PRLHFFMPGF APLTSRGSQQ YRALTPPELT QQMFDSKNMM
301 AACDPRHGRY LTVAAIFRGR MSMKEVDEQM LNVQNKSSY FVEWIPNNVK TAVCDIPPRG
361 LKMSATFIGN STAIQELFKR ISEQFTAMFR RKAFLHWYTG EGMDEMEFTE AESNMNDLVS
421 EYQQYQDATA DEQGEFEEEE GEDEA

```

**Figura 27.** Secuencia de aminoácidos de la  $\beta$ -tubulina humana





**Figura 28.** Molécula de  $\beta$ -tubulina diseñada. Se indican los sitios de unión a la tubulina del taxol, los derivados de la vinca y la colchicina.

Utilizando el sitio de unión del taxol, vinca y colchicina en la tubulina, se realizaron los ensayos de acoplamiento molecular de los catorce derivados de 3-amino-azetidin-2-ona, tomando como control la colchicina, vinblastina, y paclitaxel<sup>76</sup>. Se encontró un patrón de energía libre de acoplamiento en Kcal/mol (Tabla 12)<sup>77</sup>.

**Tabla 12.** Acoplamiento molecular de los derivados  $\beta$ -lactámicos sobre los sitios de unión de la  $\beta$ -tubulina

Código	DOCKING ( <i>Trans</i> ) (kcal/mol) Colchicine*	DOCKING ( <i>Trans</i> ) (kcal/mol) Taxol**	DOCKING ( <i>Trans</i> ) (kcal/mol) Vinca***	Código	DOCKING ( <i>Cis</i> ) (kcal/mol) Colchicine*	DOCKING ( <i>Cis</i> ) (kcal/mol) Taxol**	DOCKING ( <i>Cis</i> ) (kcal/mol) Vinca***
F-01-3t	-6.6	-6.7	-6.6	F-01-3c	-6.6	-6.7	-6.7
F-02-3t	-7.2	-6.7	-6.9	F-02-3c	-7.0	-6.4	-6.1
F-03-3t	-6.8	-6.6	-6.6	F-03-3c	-6.8	-6.4	-6.2
F-04-3t	<b>-7.5</b>	-6.9	-6.9	F-04-3c	-7.2	-6.3	-6.8
F-05-3t	-7.4	-6.9	-7.3	F-05-3c	-7.2	-6.7	-6.7
F-06-3t	-7.4	-6.8	-7.0	F-06-3c	<b>-7.6</b>	-7.0	-6.9
F-07-3t	-7.4	-6.7	-7.0	F-07-3c	-7.6	-6.6	-6.6

F-08-3t	-7.2	-6.4	-7.0	F-08-3c	-7.1	-6.9	-6.8
F-09-3t	<b>-7.7</b>	-6.8	-7.2	F-09-3c	<b>-7.7</b>	-6.6	-6.8
F-10-3t	-7.3	-6.3	-6.5	F-10-3c	-7.4	-6.2	-6.0
F-11-3t	-6.7	-7.2	-8.1	F-11-3c	-6.5	-7.2	-7.6
F-12-3t	<b>-8.9</b>	-9.4	<b>-10.2</b>	F-12-3c	<b>-7.7</b>	-9.4	-9.4
Colchicina	-7.4	---	---	Colchicina	-7.4	---	---
Paclitaxel	---	-9.8	---	Paclitaxel	---	-9.8	---
Vinblastina	---	---	-10.0	Vinblastina	---	---	-10.0

\*Sitio de unión de la colchicina

\*\*Sitio de unión del Taxol

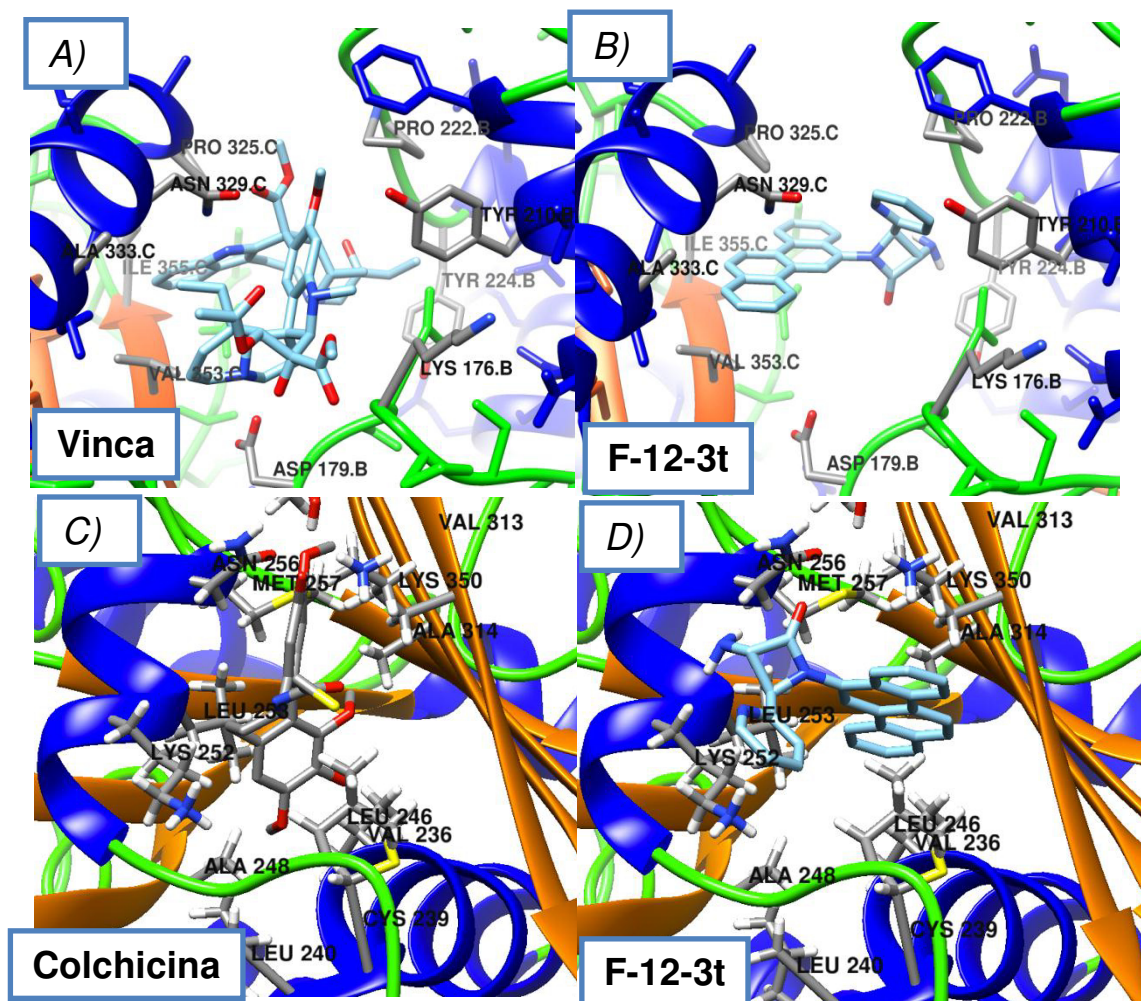
\*\*\*Sitio de unión de la Vinca

El compuesto F-12-3t, presenta una unión sobre los sitios de unión de la colchicina y la vinca, incluso superior a los controles utilizados en el análisis *in silico*. En el caso del sitio de unión de la colchicina, la misma molécula blanco presenta una afinidad de -7.4 Kcal/mol mientras que el compuesto F-12-3t presenta una afinidad de -8.9 Kcal/mol, esto nos indica al menos en el ámbito teórico que este compuesto en especial presenta una interacción mayor sobre este sitio. En el caso del sitio de la vinca, el medicamento control vinblastina presenta una afinidad de -10.0 Kcal/mol, mientras que el compuesto F-12-3t presenta una afinidad de -10.2 Kcal/mol.

Así mismo, se observa en la tabla 12, que los derivados de  $\beta$ -lactámicos no presentan una mejor afinidad sobre el sitio del taxol, comparados con el medicamento derivado del taxol (Paclitaxel).

Enseguida se procedió a realizar el análisis de las interacciones químicas entre los compuestos con el sitio de unión de la colchicina y la vinca en la estructura de la  $\beta$ -tubulina. En este ensayo se encontraron como regiones importantes de unión, tanto para

el medicamento control, como para los compuestos probados en el sitio de unión de la Colchicina, siete aminoácidos, a saber: Cys 239, Lys 252, Val 236, Met 257, Lys 350, Leu 246 y Ala 248. En el caso del sitio de Vinblastina se localizan los residuos de aminoácidos Pro 325, Asn 329, Ala 333, Ile 355, Val 353, Lys 176, Tyr 224, Tyr 210 y Pro 222 (Figura 30)<sup>78</sup>.



**Figura 29.** A) Sitio de unión de vinca con la vinblastina, B) Sitio de unión de vinca con F-12-3t, C) sitio de unión de la colchicina con la colchicina, D) sitio de unión de la colchicina con F-12-3t.

---

### 3.3. EVALUACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO*

#### 3.3.1. Actividad citotóxica sobre células Chang

Inicialmente se trabajó con la línea celular Chang <sup>79</sup>(Células humanas de hígado). En el ensayo de viabilidad celular para determinar la actividad citotóxica, se utilizó la técnica de WST-1 para los 19 compuestos de 3-amino-azetidin-2-ona, a concentraciones de 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 y 0.156  $\mu$ M. Se utilizaron como controles los siguientes: células sin tratar como control negativo (proliferación normal al 100 %), Tritón X-100 al 10 % para una muerte celular al 100 % como control positivo; como testigo de citotoxicidad la colchicina, además de un control con el solvente DMSO al 10% para ver la influencia provocada por el solvente utilizado en la disolución de los compuestos. El ensayo se repitió dos veces por triplicado (2x3) a las concentraciones mencionadas. Los porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *trans* 3-amino-azetidin-2-ona en células Chang se presentan en la tabla 13 y 14.

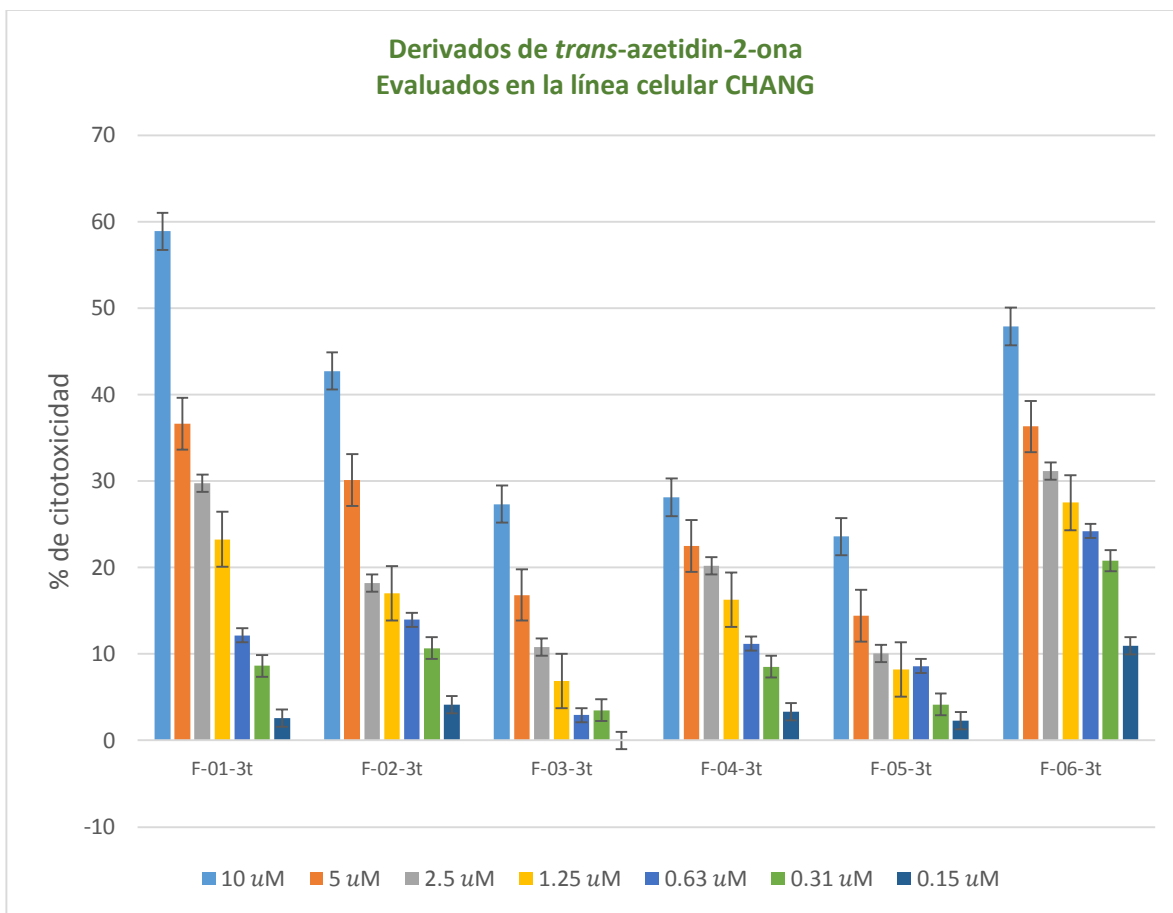
**Tabla 13.** Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *trans* 3-amino-azetidin-2-ona en células Chang (continúa en tabla 14).

CONC	F-01-3T	F-02-3T	F-03-3T	F-04-3T	F-05-3T	F-06-3T
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	58.87 $\pm$ 5	42.73 $\pm$ 8	27.33 $\pm$ 7	28.12 $\pm$ 9	23.57 $\pm$ 8	47.87 $\pm$ 5
<b>5 <math>\mu</math>M</b>	36.62 $\pm$ 3	30.09 $\pm$ 5	16.81 $\pm$ 8	22.49 $\pm$ 6	14.41 $\pm$ 6	36.31 $\pm$ 7
<b>2.5 <math>\mu</math>M</b>	29.74 $\pm$ 4	18.20 $\pm$ 3	10.82 $\pm$ 4	20.20 $\pm$ 7	10.06 $\pm$ 4	31.18 $\pm$ 4
<b>1.2 <math>\mu</math>M</b>	23.26 $\pm$ 2	17.01 $\pm$ 4	6.89 $\pm$ 3	16.27 $\pm$ 7	8.19 $\pm$ 3	27.49 $\pm$ 3
<b>0.6 <math>\mu</math>M</b>	12.16 $\pm$ 2	13.94 $\pm$ 1	2.93 $\pm$ 2	11.19 $\pm$ 4	8.58 $\pm$ 4	24.20 $\pm$ 2
<b>0.3 <math>\mu</math>M</b>	8.63 $\pm$ 1	10.68 $\pm$ 0.7	3.49 $\pm$ 1	8.54 $\pm$ 3	4.15 $\pm$ 2	20.78 $\pm$ 2
<b>0.15 <math>\mu</math>M</b>	2.56 $\pm$ 0.5	4.11 $\pm$ 1	0.70 $\pm$ 0.4	3.32 $\pm$ 2	2.25 $\pm$ 1	10.94 $\pm$ 1.5

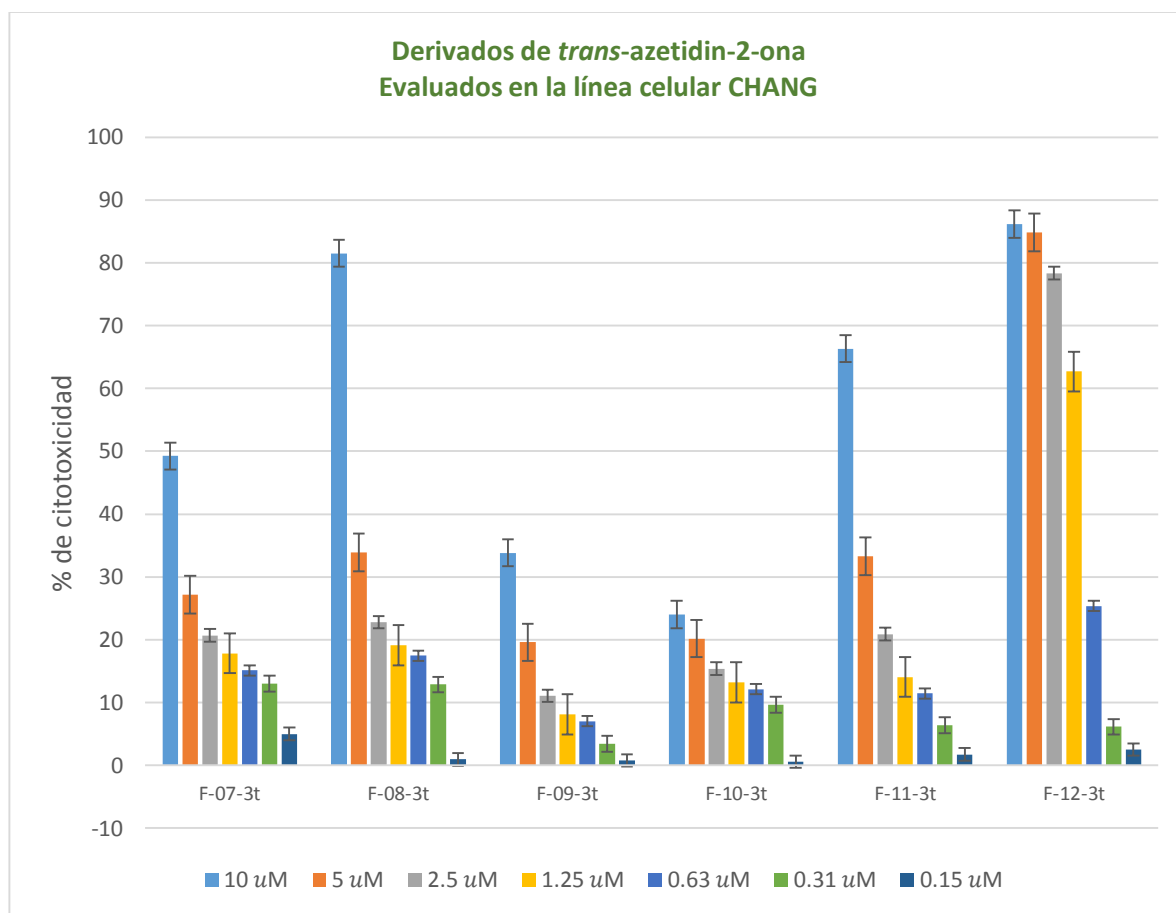
**Tabla 14.** Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *trans* 3-amino-azetidin-2-ona en células Chang (continuación de tabla 13).

CONC	F-07-3T	F-08-3T	F-09-3T	F-10-3T	F-11-3T	F-12-3T
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	49.24 $\pm$ 9	81.49 $\pm$ 8	33.82 $\pm$ 6	24.00 $\pm$ 4	66.33 $\pm$ 4	86.14 $\pm$ 5
<b>5 <math>\mu</math>M</b>	27.16 $\pm$ 6	33.87 $\pm$ 7	19.59 $\pm$ 7	20.17 $\pm$ 5	33.25 $\pm$ 3	84.82 $\pm$ 4
<b>2.5 <math>\mu</math>M</b>	20.66 $\pm$ 7	22.79 $\pm$ 6	11.08 $\pm$ 5	15.39 $\pm$ 3	20.88 $\pm$ 5	78.33 $\pm$ 3
<b>1.2 <math>\mu</math>M</b>	17.80 $\pm$ 6	19.12 $\pm$ 4	8.11 $\pm$ 4	13.20 $\pm$ 4	14.05 $\pm$ 3	62.70 $\pm$ 1
<b>0.6 <math>\mu</math>M</b>	15.13 $\pm$ 3	17.47 $\pm$ 3	7.01 $\pm$ 2	12.11 $\pm$ 2	11.46 $\pm$ 1	25.34 $\pm$ 3
<b>0.3 <math>\mu</math>M</b>	12.99 $\pm$ 2	12.85 $\pm$ 2	3.41 $\pm$ 1	9.64 $\pm$ 1	6.40 $\pm$ 2	6.14 $\pm$ 1
<b>0.15 <math>\mu</math>M</b>	4.98 $\pm$ 2	0.93 $\pm$ 0.5	0.78 $\pm$ 0.5	0.57 $\pm$ 0.2	1.73 $\pm$ 0.5	2.50 $\pm$ 0.8

En las gráficas 1 y 2 se presentan los resultados del promedio de los valores de porcentaje de citotoxicidad con los valores de desviación estándar.



**Gráfica 1.** Citotoxicidad de derivados de *trans*-3-amino-azetidin-2-ona (F-01-3t a F-06-3t) sobre células Chang.



**Gráfica 2.** Citotoxicidad de derivados de *trans*-3-amino-azetidin-2-ona (F-07-3t a F-12-3t) sobre células Chang.

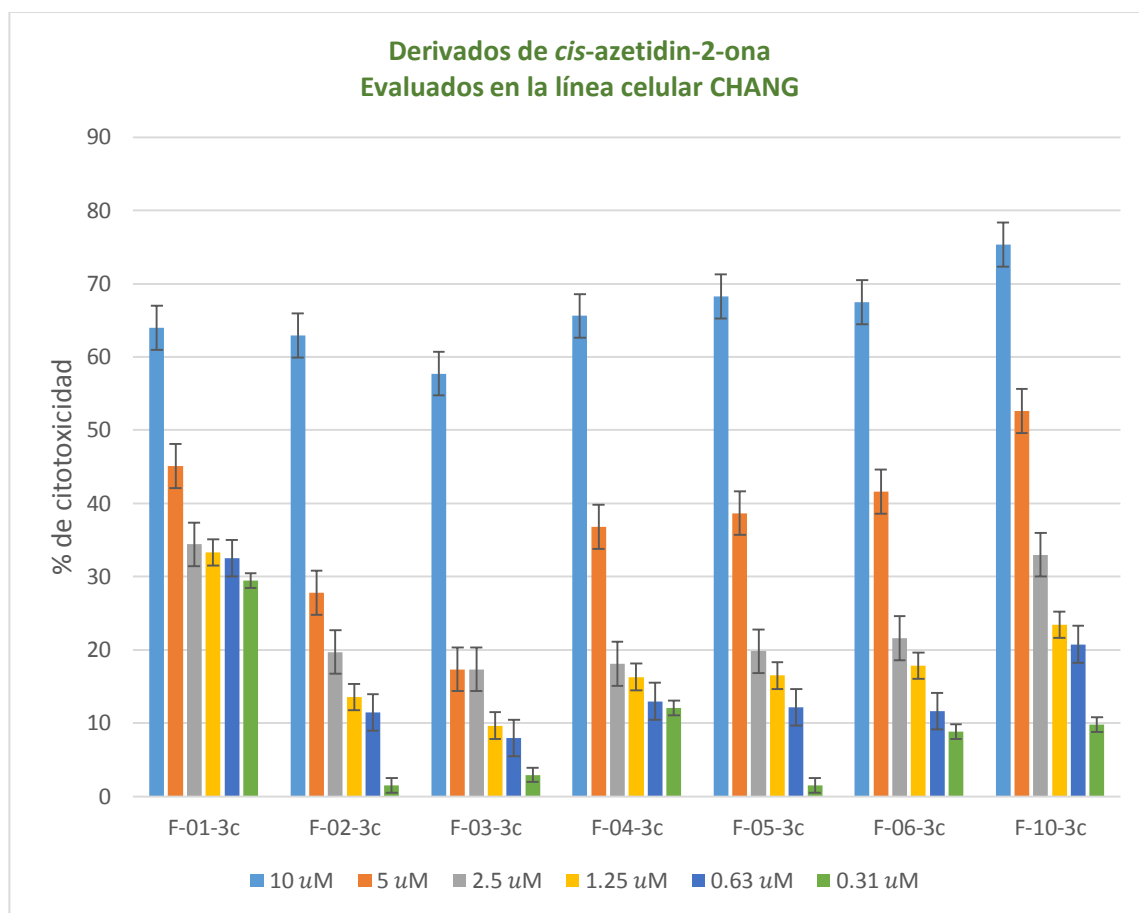
En la gráfica anterior, destaca el compuesto F-12-3t pues presenta una muerte celular elevada en las concentraciones que van hasta 630 nM, mientras que los compuestos F-02-3t, F-03-3t, F-04-3t, F-05-3t, F-06-3t, F-07-3t, F-09-3t y F-10-3t no presentan una actividad tóxica sobre la línea celular Chang, abriendo la posibilidad de ser buenos candidatos como medicamentos anticancerígenos al no atacar a células de hígado, esperando que los compuestos presenten una mayor actividad sobre células cancerígenas. Los porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *cis*-3-

amino-azetidin-2-ona en células Chang se presentan en la tabla 15 y en la gráfica 3 se presentan los compuestos derivados de 3-amino-azetidin-2-ona en configuración *cis*.

**Tabla 15.** Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *cis* 3-amino-azetidin-2-ona en células Chang.

CONC	F-01-3C	F-02-3C	F-03-3C	F-04-3C	F-05-3C	F-06-3C	F-10-3C
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	63.98 $\pm$ 8	62.93 $\pm$ 8	57.72 $\pm$ 9	65.59 $\pm$ 7	68.24 $\pm$ 9	67.48 $\pm$ 8	75.35 $\pm$ 9
<b>5 <math>\mu</math>M</b>	45.11 $\pm$ 5	27.77 $\pm$ 5	17.34 $\pm$ 4	36.77 $\pm$ 5	38.67 $\pm$ 5	41.61 $\pm$ 6	52.60 $\pm$ 7
<b>2.5 <math>\mu</math>M</b>	34.40 $\pm$ 3	19.71 $\pm$ 3	17.34 $\pm$ 4	18.10 $\pm$ 3	19.81 $\pm$ 4	21.61 $\pm$ 3	32.98 $\pm$ 5
<b>1.25 <math>\mu</math>M</b>	33.27 $\pm$ 2	13.55 $\pm$ 4	9.66 $\pm$ 3	16.30 $\pm$ 4	16.49 $\pm$ 3	17.81 $\pm$ 4	23.41 $\pm$ 3
<b>0.63 <math>\mu</math>M</b>	32.51 $\pm$ 4	11.46 $\pm$ 2	7.96 $\pm$ 1	12.98 $\pm$ 2	12.13 $\pm$ 1	11.65 $\pm$ 1	20.75 $\pm$ 2
<b>0.31 <math>\mu</math>M</b>	29.47 $\pm$ 3	1.51 $\pm$ 1	2.93 $\pm$ 0.5	12.03 $\pm$ 1	1.51 $\pm$ 0.5	8.81 $\pm$ 1	9.76 $\pm$ 0.5





**Gráfica 3.** Citotoxicidad de derivados de *cis*-3-amino-azetidin-2-ona sobre células Chang

En la presente gráfica, los compuestos presentan una mayor actividad en la concentración de 10  $\mu$ M, pero en el caso del compuesto F-10-3c parece tener la mayor actividad citotóxica.

### 3.3.2. Actividad anticancerígena en células SiHa

Posteriormente se trabajó con la línea celular SiHa (células humanas de cáncer cervicouterino) para demostrar la actividad citotóxica sobre una línea cancerígena y demostrar así la actividad **anticancerígena**.

Siguiendo los mismos pasos que para la línea celular Chang, se logró determinar la proliferación y viabilidad celular por medio de la técnica WST-1 de 8 derivados de azetidin-2-ona, este ensayo se repitió dos veces por triplicado (2x3) a las mismas concentraciones mencionadas que con las células Chang. Los porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *trans* 3-amino-azetidin-2-ona en células SiHa se presentan en las tablas 16 y 17.

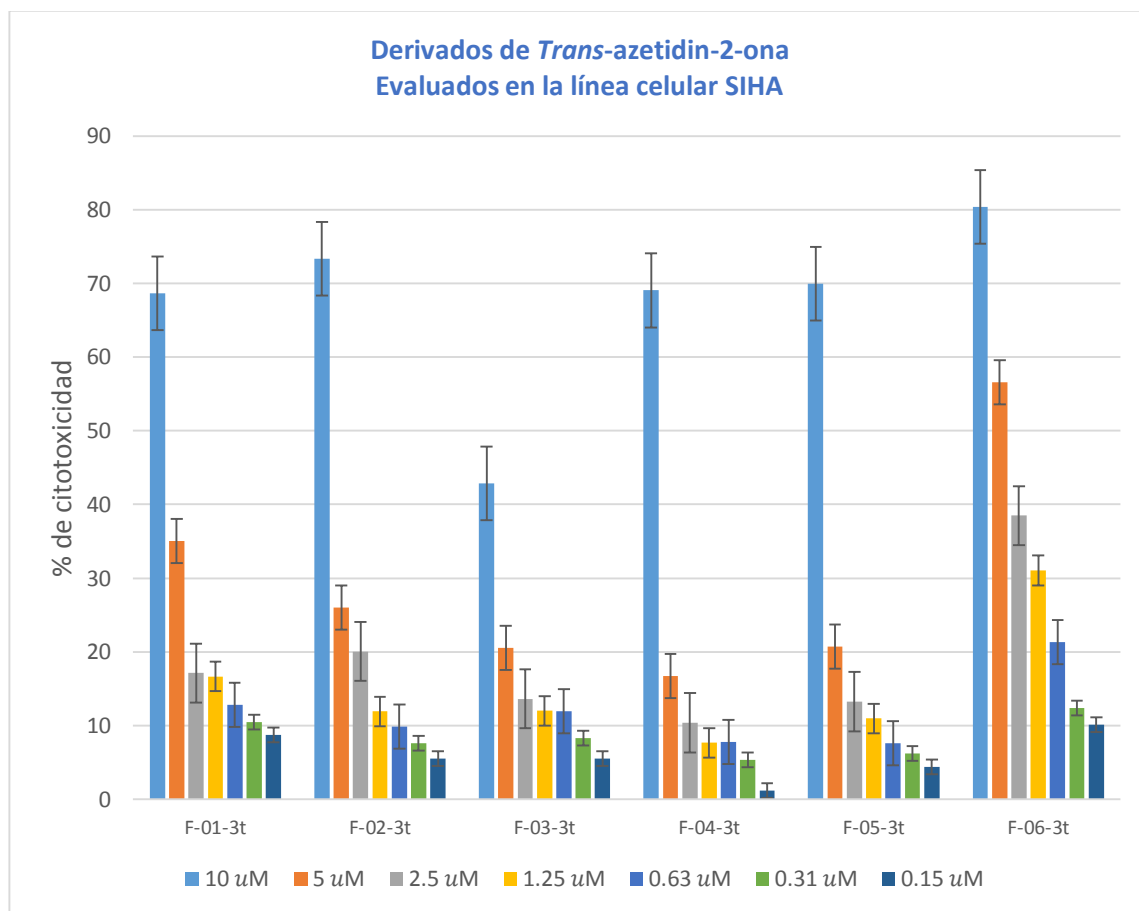
**Tabla 16.** Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *trans* 3-amino-azetidin-2-ona en células SiHa (continúa en la tabla 17).

CONC	F-01-3T	F-02-3T	F-03-3T	F-04-3T	F-05-3T	F-06-3T
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	68.64 $\pm$ 13	73.31 $\pm$ 11	42.87 $\pm$ 9	69.03 $\pm$ 12	69.93 $\pm$ 13	80.35 $\pm$ 14
<b>5 <math>\mu</math>M</b>	35.03 $\pm$ 8	25.98 $\pm$ 8	20.56 $\pm$ 7	16.72 $\pm$ 9	20.72 $\pm$ 5	56.61 $\pm$ 6
<b>2.5 <math>\mu</math>M</b>	17.12 $\pm$ 4	20.05 $\pm$ 4	13.61 $\pm$ 3	10.38 $\pm$ 5	13.25 $\pm$ 6	38.47 $\pm$ 7
<b>1.25 <math>\mu</math>M</b>	16.65 $\pm$ 3	11.91 $\pm$ 3	12.01 $\pm$ 4	7.67 $\pm$ 4	10.99 $\pm$ 2	31.05 $\pm$ 5
<b>0.63 <math>\mu</math>M</b>	12.79 $\pm$ 2	9.83 $\pm$ 2	11.96 $\pm$ 2	7.76 $\pm$ 2	7.62 $\pm$ 3	21.36 $\pm$ 3
<b>0.31 <math>\mu</math>M</b>	10.44 $\pm$ 1	7.61 $\pm$ 1	8.29 $\pm$ 0.5	5.31 $\pm$ 2	6.25 $\pm$ 2	12.39 $\pm$ 4
<b>0.15 <math>\mu</math>M</b>	8.74 $\pm$ 1.5	5.51 $\pm$ 0.5	5.50 $\pm$ 1	1.19 $\pm$ 0.5	4.36 $\pm$ 1	10.14 $\pm$ 2

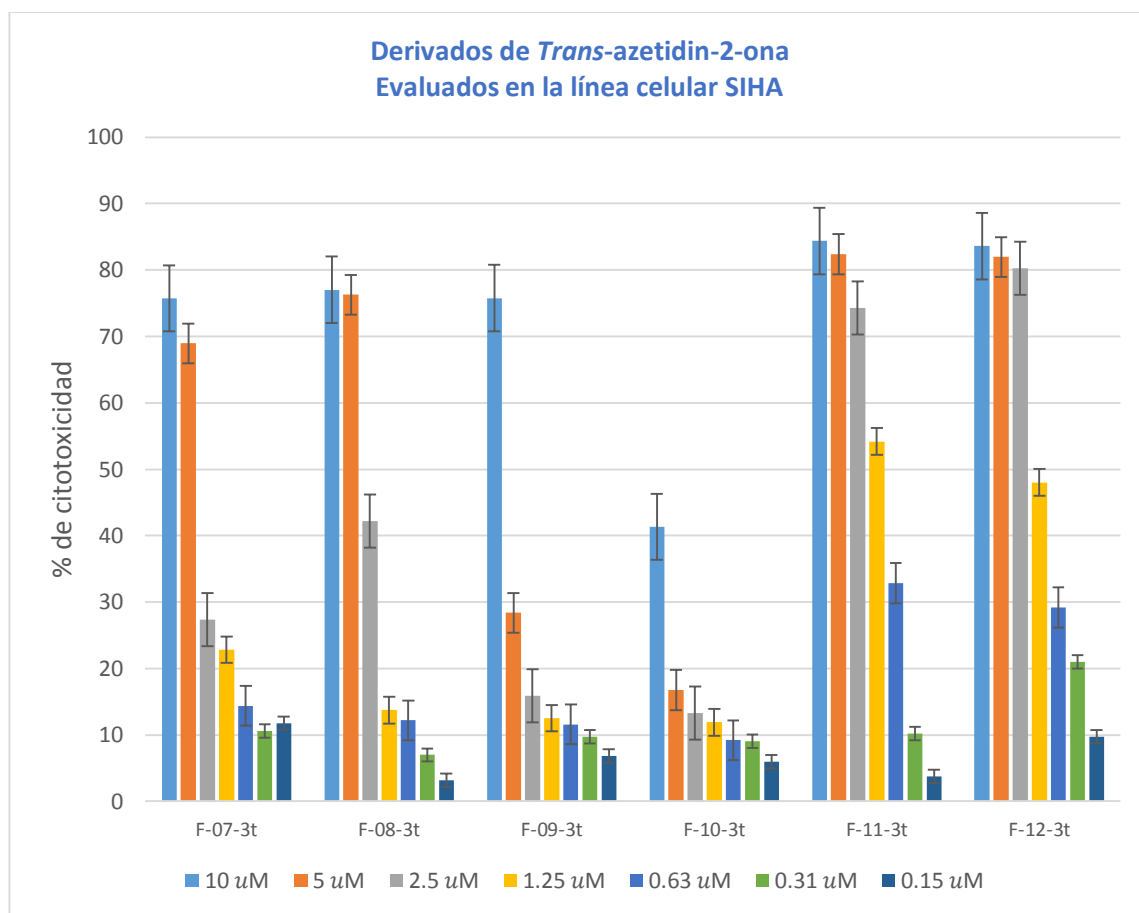
**Tabla 17.** Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *trans* 3-amino-azetidin-2-ona en células SiHa (continuación de la tabla 16).

CONC	F-07-3T	F-08-3T	F-09-3T	F-10-3T	F-11-3T	F-12-3T
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	75.72 $\pm$ 11	77.01 $\pm$ 13	75.75 $\pm$ 12	41.32 $\pm$ 14	84.38 $\pm$ 11	83.58 $\pm$ 13
<b>5 <math>\mu</math>M</b>	68.95 $\pm$ 7	76.28 $\pm$ 9	28.40 $\pm$ 7	16.76 $\pm$ 9	82.36 $\pm$ 8	81.96 $\pm$ 11
<b>2.5 <math>\mu</math>M</b>	27.31 $\pm$ 5	42.21 $\pm$ 4	15.93 $\pm$ 6	13.24 $\pm$ 6	74.27 $\pm$ 7	80.21 $\pm$ 9
<b>1.25 <math>\mu</math>M</b>	22.82 $\pm$ 4	13.73 $\pm$ 3	12.52 $\pm$ 3	11.90 $\pm$ 4	54.17 $\pm$ 4	48.02 $\pm$ 6
<b>0.63 <math>\mu</math>M</b>	14.38 $\pm$ 3	12.21 $\pm$ 2	11.57 $\pm$ 4	9.20 $\pm$ 3	32.85 $\pm$ 3	29.19 $\pm$ 4
<b>0.31 <math>\mu</math>M</b>	10.58 $\pm$ 2	6.98 $\pm$ 2	9.71 $\pm$ 1	9.03 $\pm$ 1	10.20 $\pm$ 2	20.97 $\pm$ 3
<b>0.15 <math>\mu</math>M</b>	11.78 $\pm$ 1	3.19 $\pm$ 0.5	6.86 $\pm$ 1	5.98 $\pm$ 1	3.73 $\pm$ 1	9.75 $\pm$ 0.5

Las gráficas 4 y 5 muestran los resultados de la citotoxicidad producida en las células SiHa, de los compuestos derivados *trans*-3-amino-azetidin-2-ona, con sus respectivas desviaciones estándar.



**Gráfica 4.** Citotoxicidad de derivados *trans*-3-amino-azetidin-2-ona (F-01-3t a F-06-3t) sobre células SiHa.

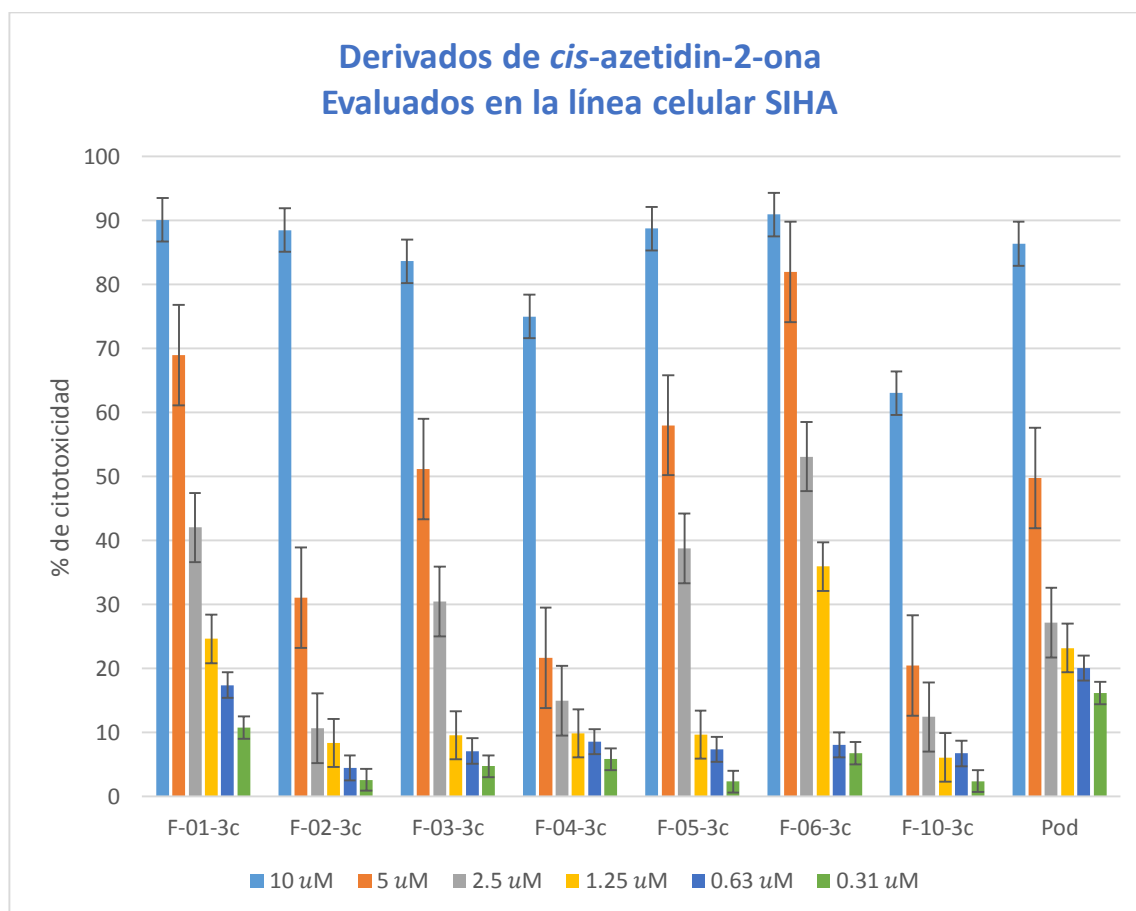


**Gráfica 5.** Citotoxicidad de derivados *trans*-3-amino-azetidin-2-ona (F-07-3t a F-12-3t) sobre células SiHa.

En la gráfica anterior destacan los compuestos F-06-3t, F-07-3t, F-08-3t, F-11-3t y F-12-3t, debido a que su actividad anticancerígena se mantiene aun cuando la concentración se disminuye. Mientras que los compuestos F-03-3t y F-10-3t, no presentan una actividad anticancerígena en la línea celular SiHa. Además, los resultados de la actividad anticancerígena con los compuestos derivados de 3-amino-azetidin-2-ona en configuración *cis* se presentan en la tabla 18 y gráfica 6.

**Tabla 18.** Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *cis* 3-amino-azetidin-2-ona en células SiHa.

CONC	F-01-3C	F-02-3C	F-03-3C	F-04-3C	F-05-3C	F-06-3C	F-10-3C	COL
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	90.10 $\pm$ 8	88.53 $\pm$ 9	83.66 $\pm$ 9	75.00 $\pm$ 11	88.74 $\pm$ 10	90.94 $\pm$ 8	63.07 $\pm$ 11	86.39 $\pm$ 9
<b>5 <math>\mu</math>M</b>	69.01 $\pm$ 11	31.07 $\pm$ 11	51.15 $\pm$ 13	21.63 $\pm$ 12	58.02 $\pm$ 8	81.96 $\pm$ 5	20.48 $\pm$ 7	49.77 $\pm$ 6
<b>2.5 <math>\mu</math>M</b>	42.02 $\pm$ 6	10.66 $\pm$ 8	30.47 $\pm$ 7	14.99 $\pm$ 5	38.79 $\pm$ 7	53.12 $\pm$ 6	12.41 $\pm$ 3	27.12 $\pm$ 3
<b>1.25 <math>\mu</math>M</b>	24.63 $\pm$ 4	8.35 $\pm$ 5	9.53 $\pm$ 4	9.87 $\pm$ 2	9.67 $\pm$ 4	35.92 $\pm$ 4	6.10 $\pm$ 2	23.20 $\pm$ 2
<b>0.63 <math>\mu</math>M</b>	17.40 $\pm$ 3	4.45 $\pm$ 2	7.10 $\pm$ 3	8.55 $\pm$ 1	7.37 $\pm$ 3	8.06 $\pm$ 2	6.70 $\pm$ 2	20.07 $\pm$ 1
<b>0.31 <math>\mu</math>M</b>	10.77 $\pm$ 1	2.57 $\pm$ 0.5	4.72 $\pm$ 2	5.83 $\pm$ 0.5	2.30 $\pm$ 0.5	6.76 $\pm$ 1	2.37 $\pm$ 0.5	16.14 $\pm$ 2



**Gráfica 6.** Citotoxicidad de derivados *cis*-amino-azetidin-2-ona sobre células SiHa.

En la gráfica anterior se muestran los derivados *cis*-amino-azetidin-2-ona, con una actividad anticancerígena mejorada comparada con la actividad citotóxica en células Chang. El porcentaje de citotoxicidad a concentración de 0.15  $\mu\text{M}$  no se muestra debido a que a esta concentración los compuestos ya no presentan ninguna actividad.

### 3.3.3. Actividad anticancerígena en células B16F10

En la evaluación biológica de la actividad anticancerígena de los compuestos se utilizó la línea celular B16F10, la cual es proveniente de melanoma murino. Esta línea en especial es importante debido a que es compatible con los modelos murinos *in vivo*. Los porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *trans* 3-amino-azetidin-2-ona en células B16F10 se presentan en las tablas 19 y 20.

**Tabla 19.** Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *trans* 3-amino-azetidin-2-ona en células B16F10 (continúa en tabla 20).

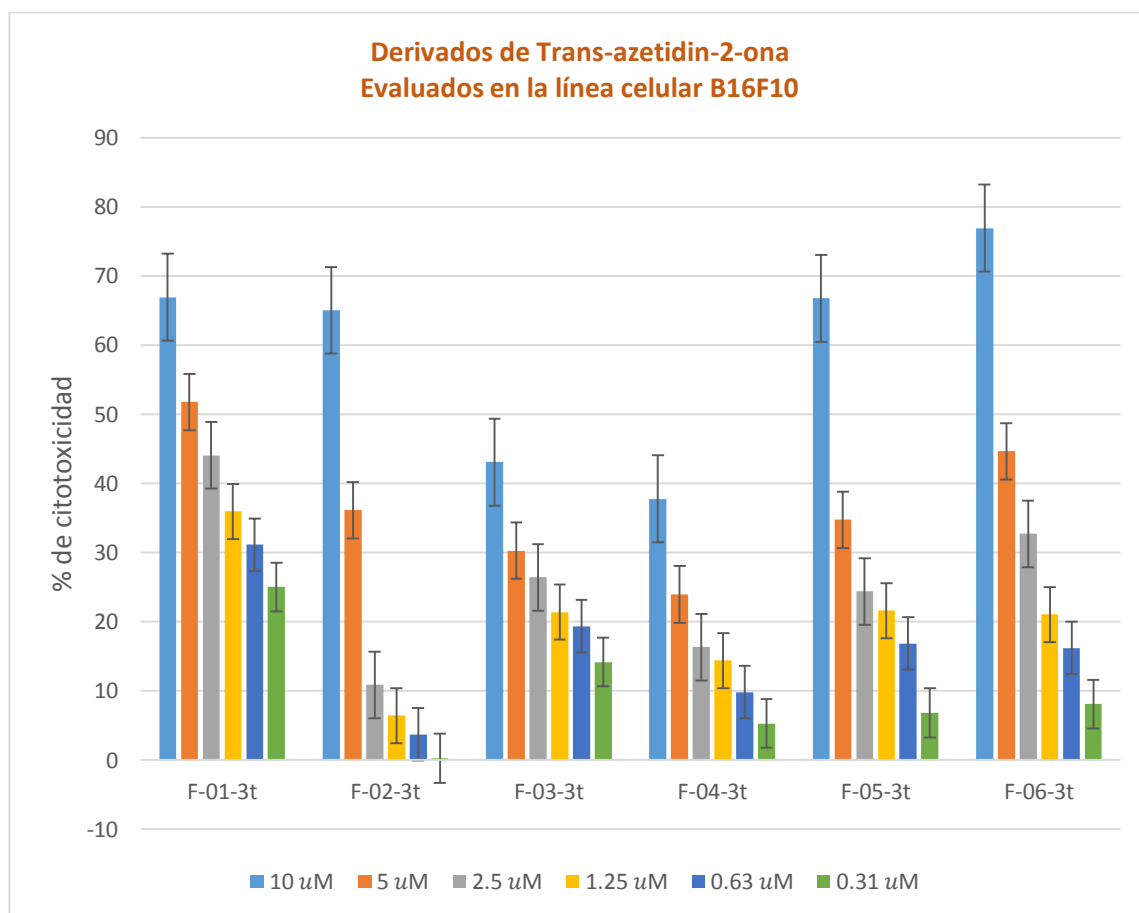
CONC	F-01-3T	F-02-3T	F-03-3T	F-04-3T	F-05-3T	F-06-3T
10 $\mu\text{M}$	66.90 $\pm$ 11	65.03 $\pm$ 13	43.06 $\pm$ 14	37.76 $\pm$ 14	66.75 $\pm$ 14	76.88 $\pm$ 8
5 $\mu\text{M}$	51.78 $\pm$ 9	36.14 $\pm$ 7	30.27 $\pm$ 9	23.95 $\pm$ 7	34.76 $\pm$ 4	44.63 $\pm$ 4
2.5 $\mu\text{M}$	44.02 $\pm$ 8	10.88 $\pm$ 4	26.40 $\pm$ 8	16.32 $\pm$ 6	24.37 $\pm$ 5	32.73 $\pm$ 5
1.25 $\mu\text{M}$	35.94 $\pm$ 7	6.42 $\pm$ 2	21.39 $\pm$ 5	14.40 $\pm$ 4	21.63 $\pm$ 2	21.07 $\pm$ 3
0.63 $\mu\text{M}$	31.12 $\pm$ 3	3.70 $\pm$ 1	19.36 $\pm$ 3	9.80 $\pm$ 3	16.87 $\pm$ 3	16.20 $\pm$ 2
0.31 $\mu\text{M}$	25.02 $\pm$ 2	0.27 $\pm$ 0.2	14.17 $\pm$ 3	5.28 $\pm$ 1	6.83 $\pm$ 2	8.10 $\pm$ 1

**Tabla 20.** Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *trans* 3-amino-azetidin-2-ona en células B16F10 (continuación de la tabla 19).

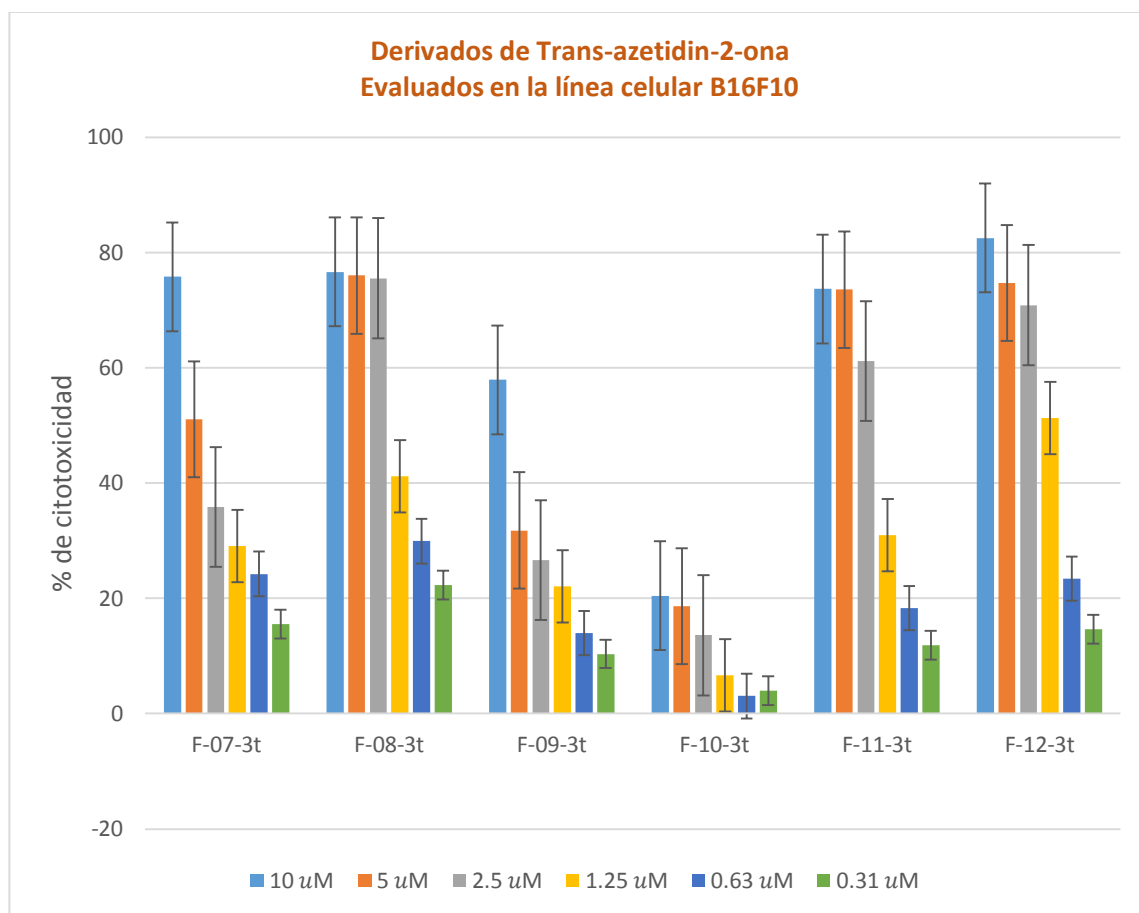
CONC	F-07-3T	F-08-3T	F-09-3T	F-10-3T	F-11-3T	F-12-3T
10 $\mu\text{M}$	75.77 $\pm$ 8	76.64 $\pm$ 9	57.91 $\pm$ 9	20.43 $\pm$ 8	73.64 $\pm$ 11	82.52 $\pm$ 10
5 $\mu\text{M}$	51.06 $\pm$ 7	75.99 $\pm$ 6	31.76 $\pm$ 8	18.62 $\pm$ 5	73.54 $\pm$ 7	74.68 $\pm$ 8
2.5 $\mu\text{M}$	35.88 $\pm$ 5	75.52 $\pm$ 3	26.64 $\pm$ 7	13.58 $\pm$ 4	61.18 $\pm$ 8	70.86 $\pm$ 6

<b>1.25 <math>\mu</math>M</b>	29.09 $\pm$ 4	41.20 $\pm$ 4	22.05 $\pm$ 2	6.66 $\pm$ 2	30.91 $\pm$ 3	51.24 $\pm$ 4
<b>0.63 <math>\mu</math>M</b>	24.22 $\pm$ 2	29.92 $\pm$ 3	13.98 $\pm$ 3	3.04 $\pm$ 2	18.32 $\pm$ 4	23.42 $\pm$ 3
<b>0.31 <math>\mu</math>M</b>	15.51 $\pm$ 2	22.29 $\pm$ 3	10.36 $\pm$ 2	3.93 $\pm$ 1	11.88 $\pm$ 1	14.61 $\pm$ 2

En las gráficas 7 y 8 se muestran los resultados del porcentaje de citotoxicidad de los 12 compuestos derivados de 3-amino-azetidin-2-ona, sobre la línea celular B16F10 con sus respectivas desviaciones estándar.



**Gráfica 7.** Citotoxicidad de derivados *trans*-3-amino-azetidin-2-ona (F-01-3t a F-06-3t) sobre células B16F10



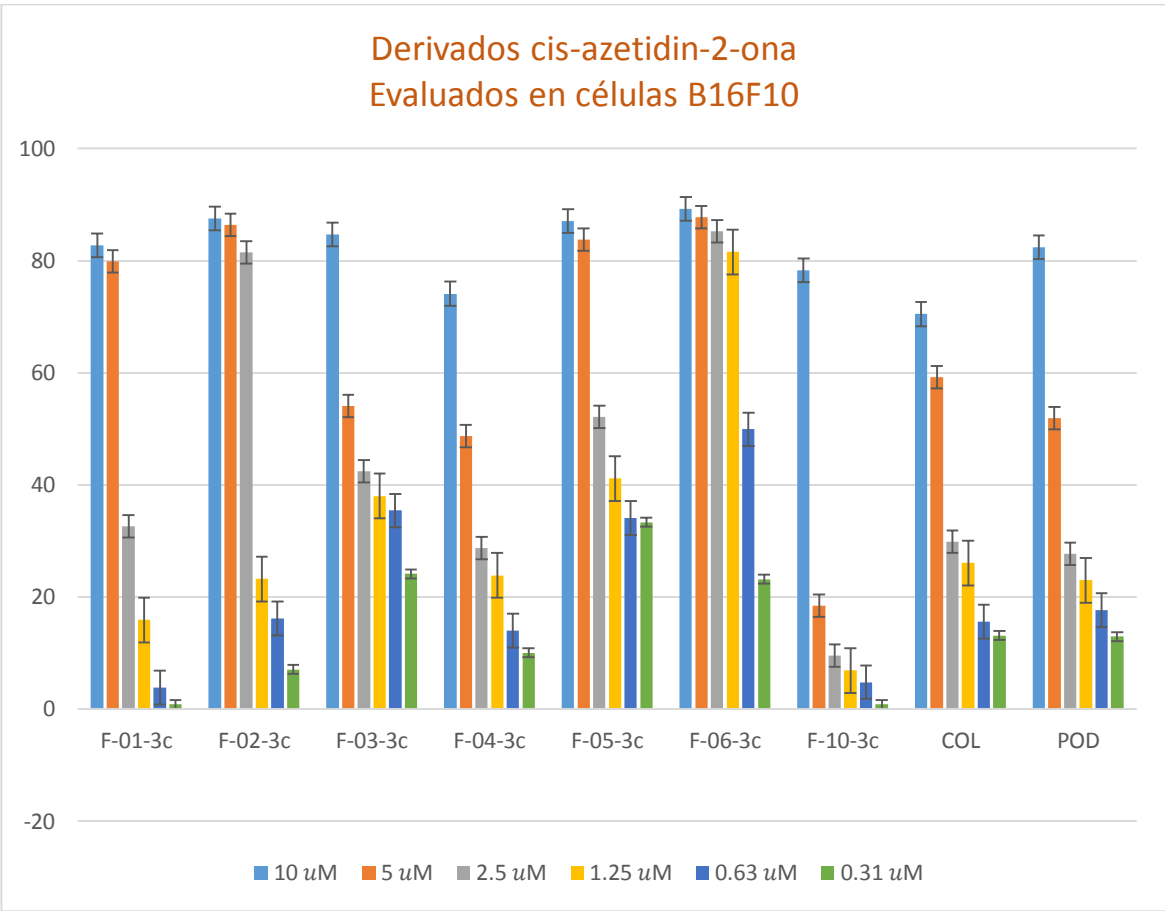
**Gráfica 8.** Citotoxicidad de derivados *trans*-3-amino-azetidin-2-ona (F-07-3t a F-12-3t) sobre células B16F10

Los compuestos F-08-3t, F-11-3t y F-12-3t presentan una mayor actividad anticancerígena sobre la línea celular B16F10. Este mismo patrón se cumple con la anterior línea celular SiHa, lo que refiere la actividad anticancerígena. Además, los resultados de la actividad anticancerígena con los compuestos derivados de 3-amino-azetidin-2-ona en configuración *cis* se presentan en la gráfica 9.



**Tabla 21.** Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *cis* 3-amino-azetidin-2-ona en células B16F10.

CON	F-01-3C	F-02-3C	F-03-3C	F-04-3C	F-05-3C	F-06-3C	F-10-3C	COL
10 $\mu$ M	82.78 $\pm$ 4	87.52 $\pm$ 8	84.70 $\pm$ 7	74.11 $\pm$ 6	87.08 $\pm$ 7	89.23 $\pm$ 6	78.28 $\pm$ 8	70.47 $\pm$ 7
5 $\mu$ M	79.86 $\pm$ 6	86.37 $\pm$ 5	54.09 $\pm$ 8	48.71 $\pm$ 4	83.78 $\pm$ 6	87.73 $\pm$ 5	18.38 $\pm$ 4	59.24 $\pm$ 5
2.5 $\mu$ M	32.55 $\pm$ 4	81.45 $\pm$ 3	42.45 $\pm$ 5	28.71 $\pm$ 6	52.09 $\pm$ 4	85.26 $\pm$ 4	9.51 $\pm$ 2	29.86 $\pm$ 3
1.25 $\mu$ M	15.89 $\pm$ 5	23.20 $\pm$ 4	38.00 $\pm$ 4	23.80 $\pm$ 4	41.15 $\pm$ 3	81.55 $\pm$ 5	6.85 $\pm$ 2	26.06 $\pm$ 4
0.63 $\mu$ M	3.81 $\pm$ 3	16.12 $\pm$ 2	35.39 $\pm$ 3	13.99 $\pm$ 3	34.10 $\pm$ 3	49.91 $\pm$ 3	4.75 $\pm$ 1	15.55 $\pm$ 2
0.31 $\mu$ M	0.78 $\pm$ 0.5	7.00 $\pm$ 1	24.09 $\pm$ 2	9.99 $\pm$ 1	33.30 $\pm$ 4	23.16 $\pm$ 2	0.82 $\pm$ 0.5	13.06 $\pm$ 1



**Gráfica 9.** Citotoxicidad de derivados *cis*-amino-azetidin-2-ona sobre células B16F10.

En la gráfica anterior, los compuestos F-01-3c, F-02-3t, F-05-3t y F-06-3t, mantienen una escasa actividad anticancerígena en concentraciones de 10  $\mu\text{M}$ .

### 3.3.4. Actividad anticancerígena en células K562

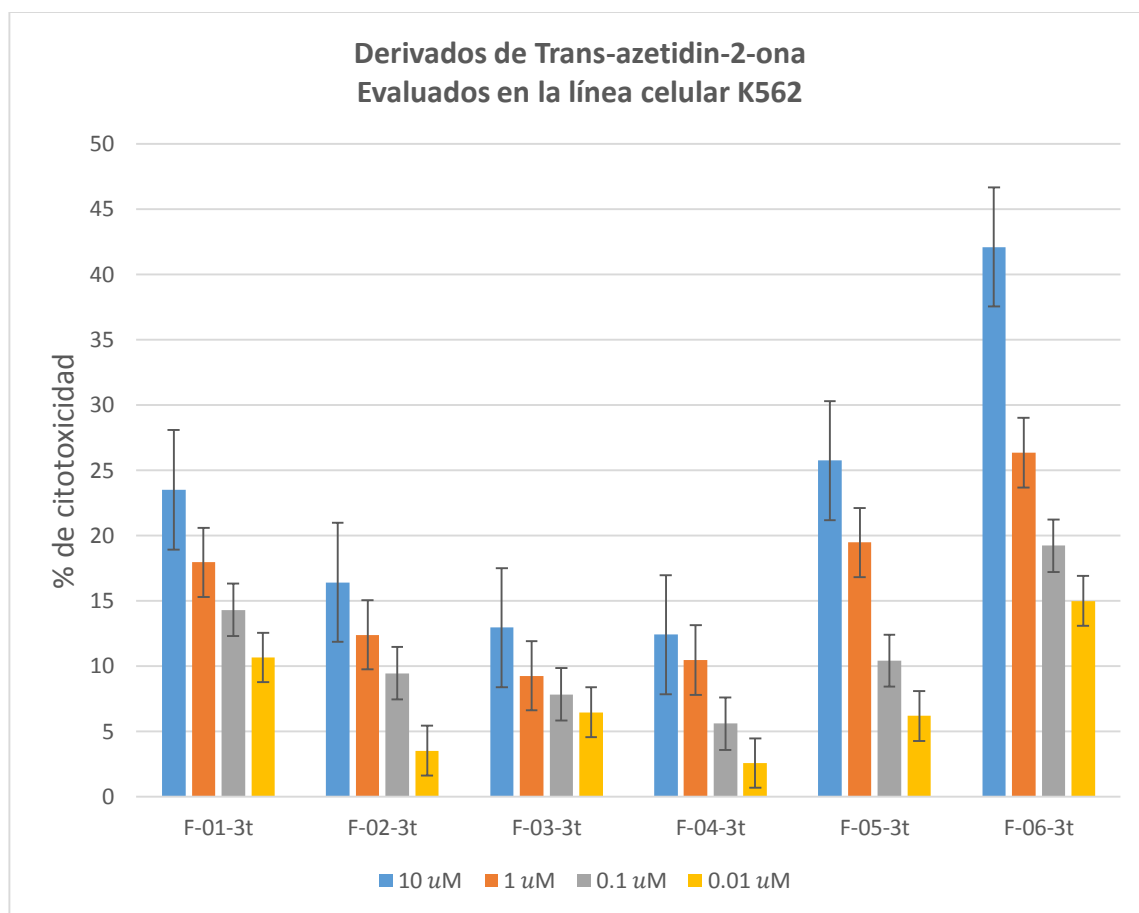
La última parte del ensayo de citotoxicidad se realizó con la línea celular K562 (Leucemia mieloide). Esta línea celular tiene la propiedad de encontrarse en suspensión, por lo que no se adhiere a la placa de cultivo celular, y por lo tanto se realizaron algunos ajustes en su manipulación y manejo. Estas células se trabajaron en medio RPMI, en una atmósfera del 5% de  $\text{CO}_2$ , a 37° C. Para los ensayos con los compuestos derivados de azetidin-2-ona, se evaluaron cuatro concentraciones 10, 1, 0.1 y 0.01  $\mu\text{M}$ . Los porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *trans* 3-amino-azetidin-2-ona en células K562 se presentan en las tablas 24 y 25. En las gráficas 10 y 11 se muestran los resultados del porcentaje de citotoxicidad de los 12 compuestos probados sobre la línea celular K562 con sus respectivas desviaciones estándar.

**Tabla 22.** Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *trans* 3-amino-azetidin-2-ona en células K562 (continúa en la tabla 23).

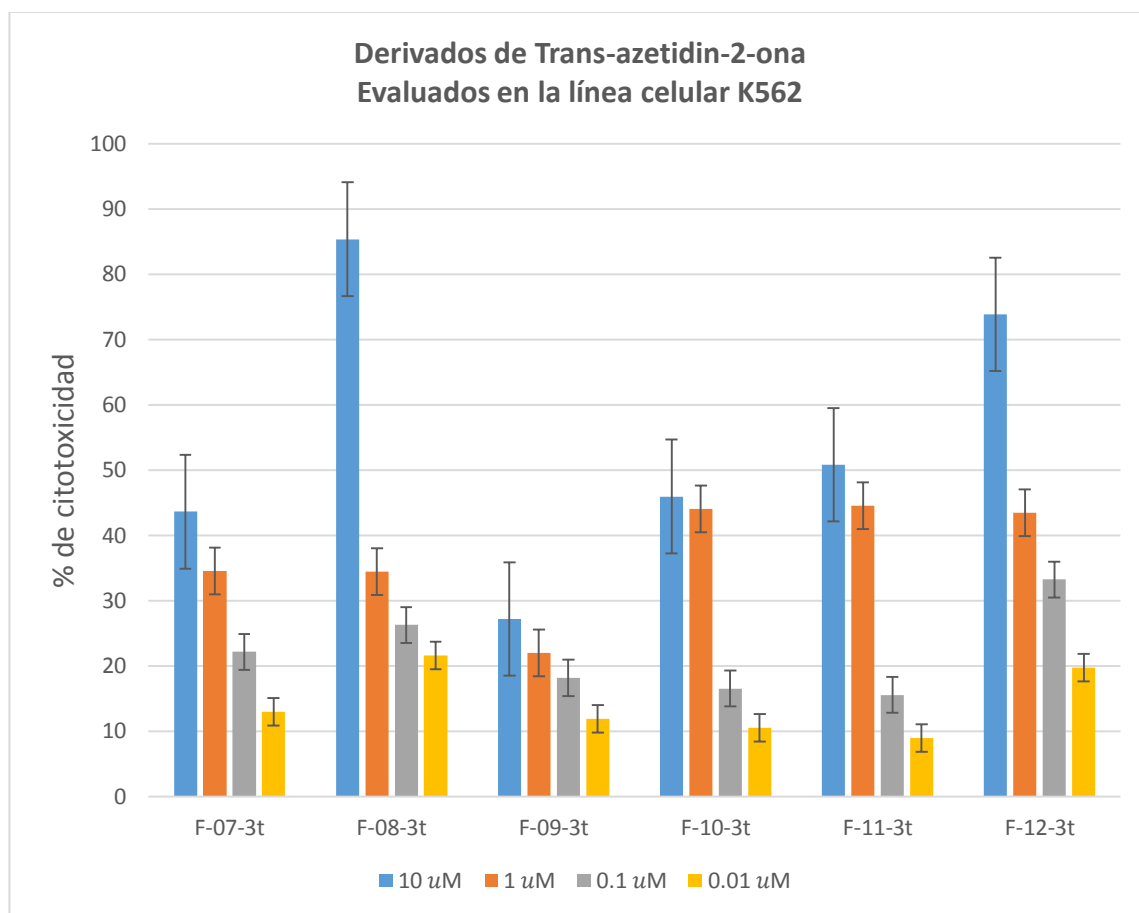
CONC	F-01-3T	F-02-3T	F-03-3T	F-04-3T	F-05-3T	F-06-3T
<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	23.48 $\pm$ 5	16.39 $\pm$ 4	12.94 $\pm$ 3	12.40 $\pm$ 2	25.73 $\pm$ 4	42.09 $\pm$ 4
<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	17.93 $\pm$ 1	12.37 $\pm$ 1	9.25 $\pm$ 2	10.46 $\pm$ 1	19.45 $\pm$ 3	26.34 $\pm$ 2
<b>0.1 <math>\mu\text{M}</math></b>	14.29 $\pm$ 0.5	9.43 $\pm$ 2	7.82 $\pm$ 1	5.58 $\pm$ 1.5	10.40 $\pm$ 2	19.22 $\pm$ 2
<b>0.01 <math>\mu\text{M}</math></b>	10.65 $\pm$ 1	3.50 $\pm$ 0.5	6.44 $\pm$ 0.5	2.56 $\pm$ 0.5	6.16 $\pm$ 1	14.98 $\pm$ 1

**Tabla 23.** Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *trans* 3-amino-azetidin-2-ona en células K562 (continuación de la tabla 22).

CONC	F-07-3T	F-08-3T	F-09-3T	F-10-3T	F-11-3T	F-12-3T
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	43.60 $\pm$ 3	85.35 $\pm$ 5	27.18 $\pm$ 2	45.92 $\pm$ 4	50.79 $\pm$ 4	73.84 $\pm$ 6
<b>1 <math>\mu</math>M</b>	34.52 $\pm$ 4	34.44 $\pm$ 4	22.01 $\pm$ 2	44.03 $\pm$ 2	44.55 $\pm$ 1	43.44 $\pm$ 2
<b>0.1 <math>\mu</math>M</b>	22.13 $\pm$ 2	26.26 $\pm$ 2	18.15 $\pm$ 1	16.53 $\pm$ 1	15.54 $\pm$ 1	33.21 $\pm$ 2
<b>0.01 <math>\mu</math>M</b>	12.94 $\pm$ 1	21.55 $\pm$ 1	11.85 $\pm$ 0.4	10.47 $\pm$ 1	8.97 $\pm$ 0.8	19.75 $\pm$ 1



**Gráfica 10.** Citotoxicidad de derivados *trans*-3-amino-azetidin-2-ona (F-01-3t a F-06-3t) sobre células K562.



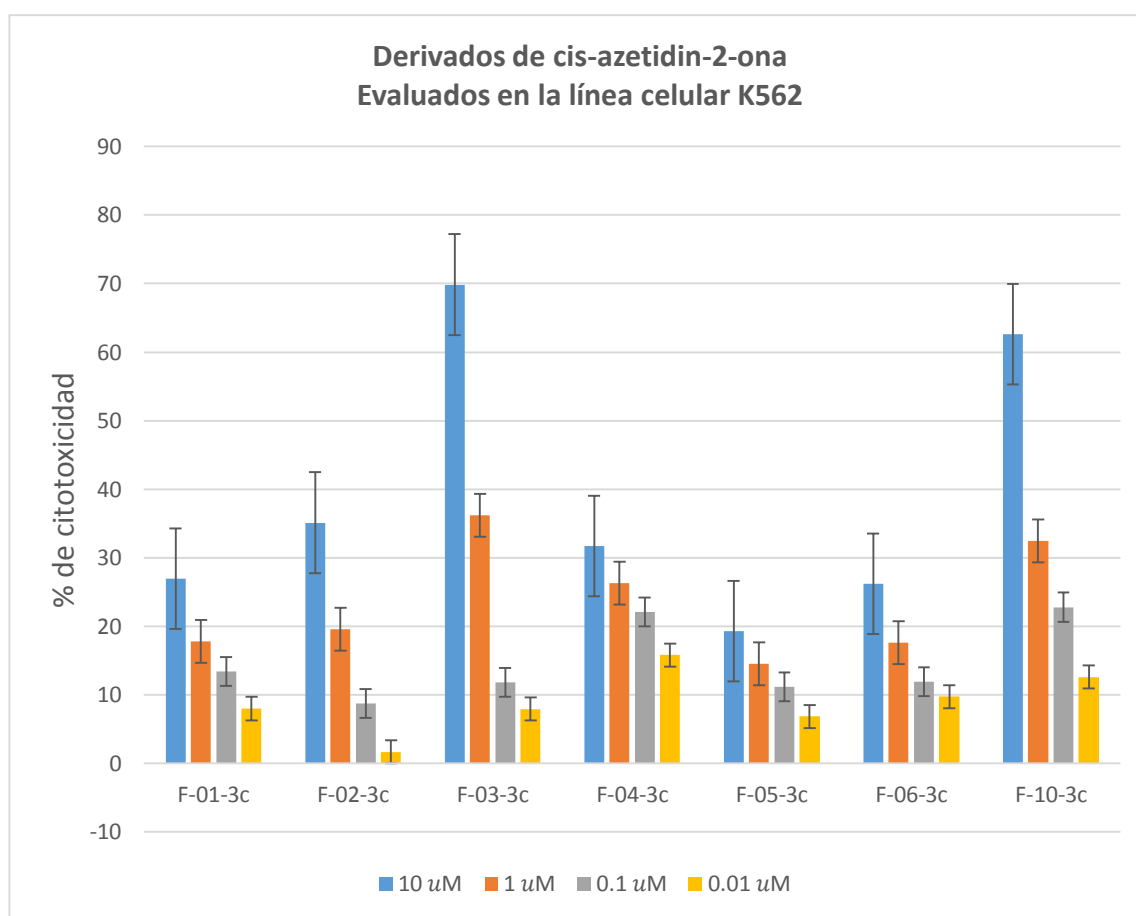
**Gráfica 11.** Citotoxicidad de derivados *trans*-3-amino-azetidin-2-ona (F-07-3t a F-12-3t) sobre células K562.

En la anterior gráfica, en su gran mayoría los compuestos derivados de azetidin-2-ona no presentan una actividad anticancerígena excepto por el caso de los compuestos F-08-3t y F-12-3t, estos compuestos ya fueron reportados en las anteriores líneas celulares como compuestos con actividad anticancerígena.

En la gráfica 12, podemos observar los resultados de la actividad citotóxica de los derivados de 3-amino-azetidin-2-ona en configuración *cis*.

**Tabla 24.** Porcentajes de citotoxicidad de los compuestos derivados de *cis* 3-amino-azetidin-2-ona en células K562.

CONC	F-01-3C	F-02-3C	F-03-3C	F-04-3C	F-05-3C	F-06-3C	F-10-3C	COL
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	26.94 $\pm$ 2	35.10 $\pm$ 4	69.84 $\pm$ 5	31.71 $\pm$ 5	19.28 $\pm$ 4	26.20 $\pm$ 4	62.61 $\pm$ 6	82.39 $\pm$ 6
<b>1 <math>\mu</math>M</b>	17.75 $\pm$ 1	19.57 $\pm$ 3	36.14 $\pm$ 3	26.27 $\pm$ 3	14.48 $\pm$ 2	17.62 $\pm$ 2	32.44 $\pm$ 3	51.85 $\pm$ 4
<b>0.1 <math>\mu</math>M</b>	13.41 $\pm$ 0.8	8.71 $\pm$ 1	11.77 $\pm$ 2	22.06 $\pm$ 1	11.15 $\pm$ 1	11.90 $\pm$ 2	22.78 $\pm$ 2	27.68 $\pm$ 3
<b>0.01 <math>\mu</math>M</b>	7.97 $\pm$ 1	1.65 $\pm$ 0.5	7.92 $\pm$ 1	15.79 $\pm$ 1.5	6.82 $\pm$ 0.8	9.74 $\pm$ 1	12.57 $\pm$ 1	22.97 $\pm$ 2



**Gráfica 12.** Citotoxicidad de derivados *cis*-amino-azetidin-2-ona sobre células K562.

En esta gráfica cobra relevancia la escasa actividad del compuesto F-06-3c, que presentó anteriormente una actividad anticancerígena considerablemente buena.

Mientras que el compuesto F-03-3c tiene una actividad superior en esta línea celular K562.

### 3.3.5. Determinación de la concentración inhibitoria media máxima (CI<sub>50</sub>)

En la determinación de la concentración inhibitoria al cincuenta por ciento, se utilizó el programa Graphpad prism para los cálculos. En la tabla 25, se presentan los resultados de CI<sub>50</sub> de los derivados de 3-amino-azetidin-2-ona, en las líneas celulares cancerígenas SiHa, B16F10 y K562, además la línea celular Chang.

**Tabla 25.** Concentración inhibitoria cincuenta de los derivados de 3-amino-azetidin-2-ona.

ID	SIHA CI <sub>50</sub>	B16F10 CI <sub>50</sub>	K562 CI <sub>50</sub>	CHANG CI <sub>50</sub>	ID	SIHA CI <sub>50</sub>	B16F10 CI <sub>50</sub>	K562 CI <sub>50</sub>	CHANG CI <sub>50</sub>
F-01-3t	7.17	5.16	>10.00	7.91	F-01-3c	4.21	3.33	>10.00	6.21
F-02-3t	7.14	7.63	>10.00	>10.00	F-02-3c	6.20	1.71	>10.00	8.03
F-03-3t	>10.00	>10.00	>10.00	>10.00	F-03-3c	5.10	3.91	6.14	9.32
F-04-3t	8.12	>10.00	>10.00	>10.00	F-04-3c	7.28	5.91	>10.00	7.37
F-05-3t	7.79	7.14	>10.00	>10.00	F-05-3c	4.03	2.09	>10.00	7.01
F-06-3t	4.79	5.79	>10.00	>10.00	<b>F-06-3c</b>	<b>2.34</b>	<b>0.70</b>	<b>&gt;10.00</b>	<b>6.89</b>
F-07-3t	3.69	5.24	>10.00	>10.00	F-07-3c	---	---	---	---
<b>F-08-3t</b>	<b>3.23</b>	<b>1.49</b>	<b>6.05</b>	<b>3.92</b>	F-08-3c	---	---	---	---
F-09-3t	6.92	8.34	>10.00	>10.00	F-09-3c	---	---	---	---
F-10-3t	>10.00	>10.00	>10.00	>10.00	F-10-3c	8.43	>10.00	6.86	5.49
<b>F-11-3t</b>	<b>1.47</b>	<b>2.03</b>	<b>1.15</b>	<b>7.42</b>	<b>Colchicina</b>	<b>2.5</b>	<b>4.1</b>	<b>1.3</b>	<b>0.52</b>
<b>F-12-3t</b>	<b>1.39</b>	<b>1.55</b>	<b>3.65</b>	<b>1.41</b>					

### **3.4. CONJUGACIÓN TRASTUZUMAB/AZETIDIN-2-ONA**

#### **3.4.1. Selección del derivado de 3-amino-azetidin-2-ona a conjugar con Trastuzumab**

El compuesto F-12-3t fue seleccionado para conjugarse al anticuerpo monoclonal (Trastuzumab), debido a que fue el compuesto que presentó una mayor actividad biológica. En el estudio computacional mostró los posibles blancos de conjugación, estarían ubicados en la  $\beta$ -tubulina, teniendo una interacción mayor que vinblastina y colchicina. En la actividad anticancerígena frente a células SiHa, B16F10 y K562, presentó un  $CI_{50}$  de 1.39, 1.55 y 3.65  $\mu M$  respectivamente.

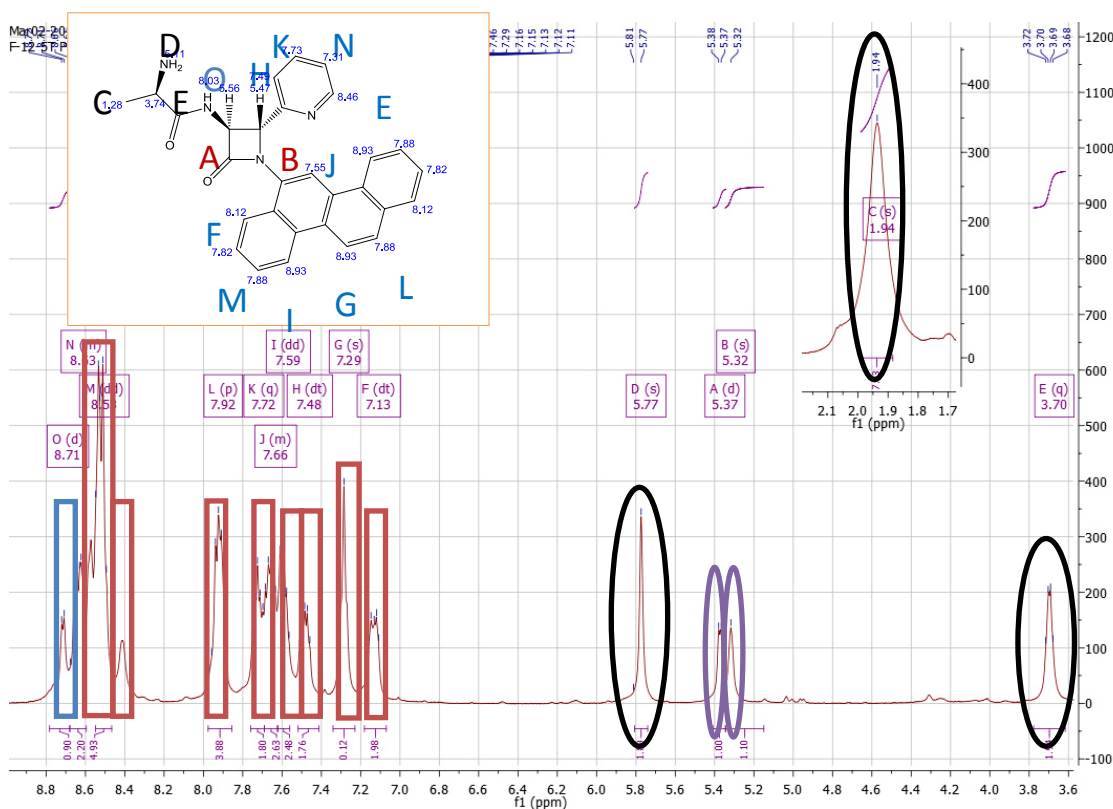
#### **3.4.2. Conjugación Trastuzumab/azetidin-2-ona**

La metodología de conjugación consta de varios pasos, y el primero es unir un aminoácido, en este caso se utilizó la Boc-alanina. Al hacer reaccionar la boc-alanina al compuesto F-12-3t, se obtuvo una unión de la alanina en posición tres del anillo de azetidin-2-ona. Posteriormente, se adicionó ácido clorhídrico en ácido acético glacial 1:1, por 30 min, y se realizó una extracción en acetato de etilo, con NaCl,  $NaHCO_3$ , y  $Na_2SO_4$ . Se purificó por cromatografía en columna, y se llevó a rotavapor para eliminar el solvente y obtener un compuesto sólido, al cual se le realizó un análisis de RMN con el código F-12-5t.

#### **3.4.3. Resonancia magnética nuclear de protón de F-12-5t**

En el espectro de RMN de protón se lograron identificar los diferentes protones del compuesto F-12-5t. En la región de 7 a 9 ppm se encuentra los protones de los anillos aromáticos, en la región de 5-6 ppm se encuentran los protones pertenecientes a

los del anillo de azetidín-2-ona, en la región de 1.9 un singulete perteneciente al NH<sub>2</sub>, en 3.7 ppm se encuentran los protones del grupo metilo, como se muestra a continuación (Figura 31).



**Figura 30.** Espectro de RMN del compuesto F-12-5t

Posteriormente, se realizó la conjugación de Trastuzumab con *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio) pentanoato. Para posteriormente pasar a la conjugación de Trastuzumab con el compuesto F-12-5t. En la figura 32, se muestran los posibles aminoácidos donde pudiera haber sucedido esta reacción; marcados en rojo las argininas (R), verde lisinas (K), amarillo glutamina y asparagina. La literatura marca que el posible receptor de las moléculas pequeñas en los anticuerpos son las argininas (R). En la figura 33, se muestra el anticuerpo marcado de color azul, y los residuos antes mencionados en la región Fab.



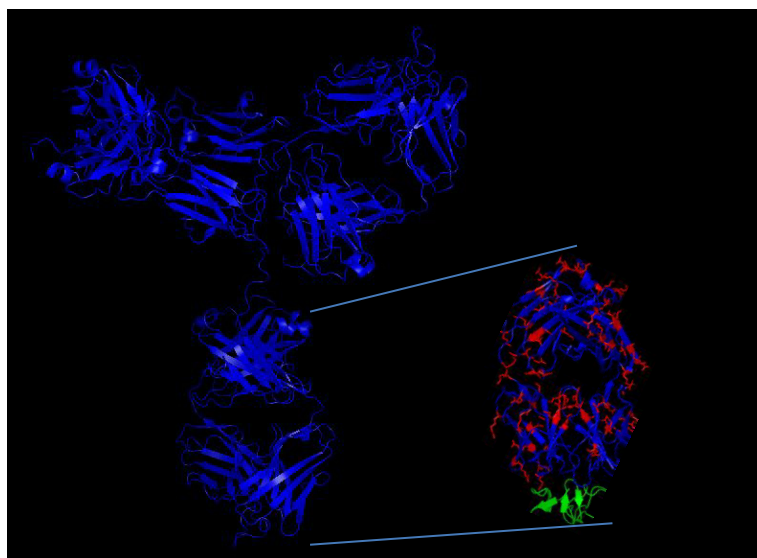
```

>1N8Z:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRRSGTDFLTITISLQP
EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKEFNRRGEC

>1N8Z:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFRNIIDTYIHWFQAPGKGLEWVAIRIYPTNGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAY
LQMNSLRDAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP

```

**Figura 31.** Posibles sitios de unión de la molécula pequeña al anticuerpo



**Figura 32.** Los posibles sitios de unión en Trastuzumab

#### 3.4.4. Identificación de la unión del compuesto F-12-5t al Trastuzumab

Para lograr la evidencia de una posible unión del compuesto derivado de azetidin-2-ona al Trastuzumab, se utilizó la técnica de espectrometría de masas ESI-QSTAR XL (ABSCIEX, Framingham, MA, USA). Se envió a analizar una pequeña muestra (aproximadamente 500  $\mu$ l) con una concentración de 50  $\mu$ g/ml. El volumen de la muestra se redujo por liofilización a 80  $\mu$ l. La solución resultante se acidifica y se inyectó al Sistema ESI-TOF RP (1000A). La columna de captura se fijó en 80°C. La

---

mezcla de proteína se eluyó por 75% B (70% de ACN y 30% de isopropanol + 0,6% FA).

**Calibración:** La muestra control de los análisis (mioglobina de corazón de caballo) fue medida en cinco repeticiones a (10 pmol/ $\mu$ l en 1:1 de agua/acetonitrilo inyectado a 5  $\mu$ l/min) la cual presentó un peso de 16,951 Da y la desviación estándar de la media fue de alrededor de 1-2 Da.

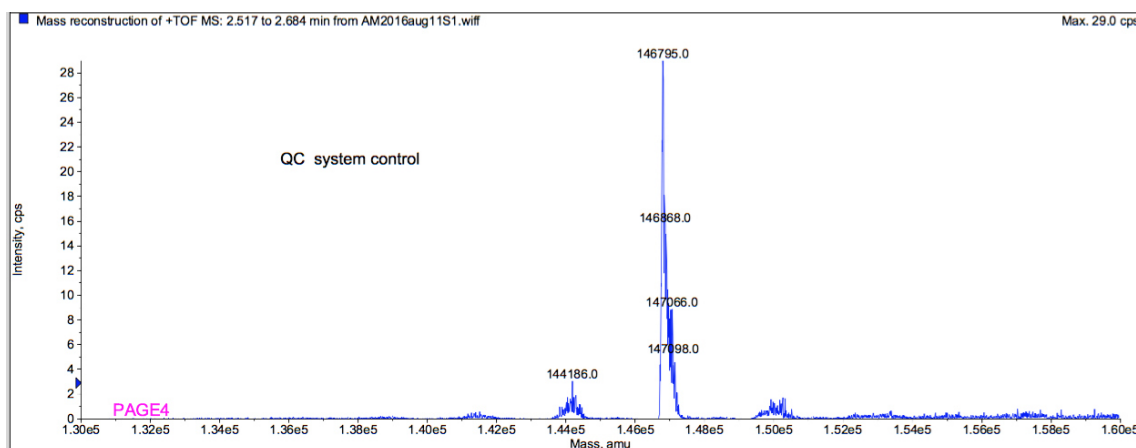
**Procesamiento de datos:** La herramienta informática utilizada para reconstruir la proteína fue el software BioAnalysis v1.1.5 para la deconvolución de la muestra (se refiere a las operaciones matemáticas empleadas en restauración de señales para recuperar datos que han sido degradados por un proceso físico). Este procedimiento identifica secuencias de picos con carga múltiple pertenecientes a una sola molécula paterna identificada, y transforma la serie en un solo pico en el espectro de carga cero. Esto dio como resultado el siguiente espectro (Figura 34):



El Trastuzumab se compone de 1328 aminoácidos. Contiene dos cadenas pesadas idénticas (CP) y dos cadenas ligeras idénticas (CL) unidas a través de enlaces disulfuro. Cada cadena pesada contiene 450 aminoácidos, y cada cadena ligera contiene 214

aminoácidos. Las respectivas masas moleculares teóricas (MR) y los valores de punto isoelectrico (pI) son 49,284.65 Da y 8.49 para las cadenas pesadas y 23,443.1 Da y 7.76 para la cadenas ligeras. De acuerdo a estos valores, el MR teórico de Trastuzumab no glicosilado es de 144,186.0 Da<sup>80 81</sup>.

En el caso del Trastuzumab unido al derivado de azetidin-2-ona, se observó un aumento de la masa molecular de 2,609 Da lo que nos lleva a sugerir que la conjugación se logró con cuatro moléculas de azetidin-2-ona (F-12-5t) ascendiendo a aproximadamente 146, 795.0 Da (Figura 35).

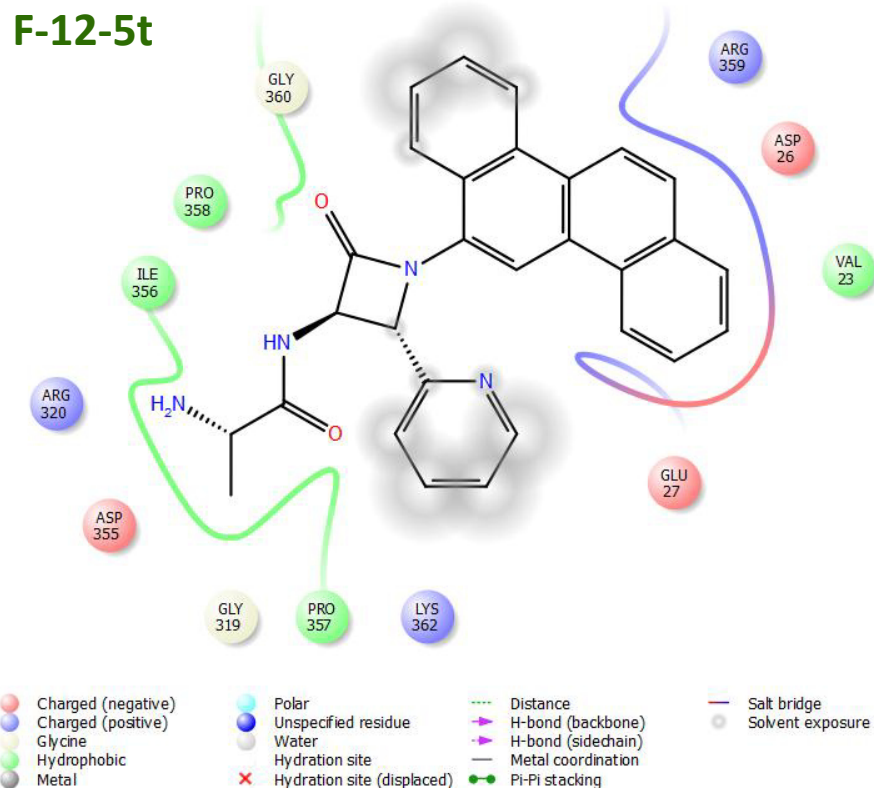


**Figura 34.** Espectro de MS – EIS TOF de Trastuzumab-azetidin-2-ona

### 3.4.5. Acoplamiento molecular del compuesto F-12-5t en el sitio de la colchicina

Además se realizó un análisis *in silico* del acoplamiento molecular del compuesto, después de ser liberado dentro la célula. Las interacciones químicas entre los residuos de aminoácidos Ile 356, Asp 355 y Pro 357, favorecen la unión a través de puentes de hidrógeno con el compuesto F-12-5t. Además, O'Boyle<sup>28</sup> menciona que las

azetidin-2-onas, interaccionan significativamente con los residuos Thr 179, Cys 241, Val 318 y Lys 352 (Figura 36).



**Figura 35.** Análisis de la posible interacción química sobre la  $\beta$ -tubulina

---

### 3.5. EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL CONJUGADO TRASTUZUMAB/AZETIDIN-2-ONA

#### 3.5.1. Resultados en la línea celular Chang

Particularmente para este parámetro, al inicio se trabajó con la línea celular Chang, esto para tener la evidencia del conjugado frente a células que no sobreexpresan el receptor Her-2. Las células presentaron un crecimiento exponencial aproximadamente a las 72 horas, logrando una confluencia de hasta un 80% ( $2.5-3.5 \times 10^6$  células/caja) en condiciones de crecimiento a 37°C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en MEM adicionado con SFB al 10% y antibiótico al 1%. En el ensayo de viabilidad celular para determinar la actividad citotóxica, se utilizó la técnica de WST-1 para el conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona, a concentraciones de 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 y 0.156 µg/mL. Se utilizaron como controles los siguientes: células sin tratar como control negativo (proliferación normal al 100 %), Tritón X-100 al 10 % para una muerte celular al 100 % como control positivo; como testigo de citotoxicidad el Trastuzumab. El ensayo se repitió dos veces por triplicado (2x3) a las concentraciones mencionadas. Los porcentajes de citotoxicidad del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona en células Chang se presentan en la tabla 26.

**Tabla 26.** Porcentajes de citotoxicidad del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona en células Chang.

CHANG		
Conc.	AB/AZ	AB
10 µg/mL	32.77 ± 3.3	13.63 ± 4.1
5 µg/mL	30.57 ± 4.5	8.09 ± 3.0
2.5 µg/mL	33.87 ± 4.7	6.03 ± 3.6
1.25 µg/mL	25.70 ± 4.9	5.07 ± 3.4
0.625 µg/mL	33.53 ± 2.7	1.83 ± 0.7
0.3125 µg/mL	29.67 ± 0.8	0.71 ± 2.6

En la tabla anterior se puede observar que las células de Chang no son afectadas por el anticuerpo monoclonal (Trastuzumab), y de la misma forma, tampoco el conjugado de Trastuzumab/ azetidin-2ona causa un efecto tóxico.

### 3.5.2. Resultados en la línea celular SiHa

Se realizó de igual forma, el estudio en células SiHa, las cuales son cancerígenas pero no presenta una sobreexpresión del receptor Her-2. La técnica de viabilidad WST-1 se utilizó como se describe en la sección anterior. El ensayo se repitió dos veces por triplicado (2x3) a las concentraciones de 10 a 0.3125 µg/mL. Los porcentajes de citotoxicidad del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona en células SiHa se presentan en la tabla 27.

**Tabla 27.** Porcentajes de citotoxicidad del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona en células SiHa.

Conc.	SIHA	
	AB/AZ	AB
10 µg/mL	85.76 ± 0.4	13.25 ± 3.1
5 µg/mL	35.03 ± 3.9	12.55 ± 2.8
2.5 µg/mL	13.70 ± 1.5	11.02 ± 2.6
1.25 µg/mL	10.78 ± 3.9	10.19 ± 2.1
0.625 µg/mL	8.41 ± 3.0	9.42 ± 2.4
0.3125 µg/mL	5.97 ± 1.6	3.40 ± 3.3

El estudio reveló que el conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona, presentaba una pobre actividad a una concentración de 10 µg/mL, mientras que el Trastuzumab no presentaba una actividad anticancerígena frente a células SiHa.

### 3.5.3. Resultados en la línea celular K562

Se realizó el estudio en la línea celular K562, estas células tienen una sobreexpresión del receptor Her-2, además de ser células cancerígenas. La técnica de viabilidad WST-1 se utilizó como se describe en la sección anterior. El ensayo se repitió dos veces por triplicado (2x3) a las concentraciones mencionadas. Los porcentajes de citotoxicidad del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona en células K562 se presentan en la tabla 28.



**Tabla 28.** Porcentajes de citotoxicidad del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona en células K562.

<b>K562</b>		
<b>Conc.</b>	<b>AB/AZ</b>	<b>AB</b>
<b>10 µg/mL</b>	77.13 ± 10.2	50.07 ± 11.0
<b>5 µg/mL</b>	62.78 ± 8.7	40.49 ± 9.7
<b>2.5 µg/mL</b>	50.35 ± 4.6	34.91 ± 8.8
<b>1.25 µg/mL</b>	34.56 ± 3.4	32.22 ± 4.9
<b>0.625 µg/mL</b>	25.88 ± 4.6	21.71 ± 5.3
<b>0.3125 µg/mL</b>	11.85 ± 2.1	14.80 ± 8.6

En la tabla anterior se observa una actividad superior del conjugado Trastuzumab/ azetidin-2-ona comparada al Trastuzumab, la actividad al 50 % se ve presente hasta una concentración de 2.5 µg/mL, mientras que el Trastuzumab es de tan solo 10 µg/mL.

#### **3.5.4. Resultados en la línea celular MCF-7**

Se realizó el estudio en la línea celular MCF-7, estas células tiene una sobreexpresión del receptor Her-2, además de ser células cancerígenas. La técnica de viabilidad WST-1 se utilizó como se describe en la sección anterior. El ensayo se repitió dos veces por triplicado (2x3) a las concentraciones de 10 µg/mL a 0.1525 µg/mL. Los porcentajes de citotoxicidad del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona en células MCF-7 se presentan en la tabla 29.

**Tabla 29.** Porcentajes de citotoxicidad del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona en células MCF-7.

<b>MCF-7</b>		
<b>Conc.</b>	<b>AB/AZ</b>	<b>AB</b>
<b>10 µg/mL</b>	85.76 ± 2.8	94.89 ± 1.2
<b>5 µg/mL</b>	76.07 ± 1.9	94.52 ± 0.4
<b>2.5 µg/mL</b>	76.74 ± 0.2	86.94 ± 0.2
<b>1.25 µg/mL</b>	78.07 ± 0.3	83.87 ± 1.7
<b>0.625 µg/mL</b>	73.48 ± 0.6	79.9 ± 0.7
<b>0.3125 µg/mL</b>	69.01 ± 1.4	70.31 ± 2.1
<b>0.1512 µg/mL</b>	47.03 ± 1.7	49.7 ± 2.5

En la tabla anterior el conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona presentó una actividad anticancerígena en concentraciones de 0.1512 mg/mL, así mismo el Trastuzumab sin conjuagar presenta una actividad anticancerígena.

#### **3.5.4. Resultados de concentración inhibitoria media máxima del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona.**

La determinación de la concentración inhibitoria cincuenta, se calculó con ayuda del programa Graphpad prism. En la tabla 30, se presentan los resultados de  $CI_{50}$  del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona, en las líneas celulares cancerígenas SiHa, K562, MCF-7 y Chang.

**Tabla 30.** Concentración inhibitoria máxima media de conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona.

	CI <sub>50</sub>	
	AB/AZ	AB
<b>SiHa</b>	6.13 µg/mL	>10 µg/mL
<b>K562</b>	2.5 µg/mL	10 µg/mL
<b>MCF-7</b>	0.105 µg/mL	0.364 µg/mL
<b>Chang</b>	>10 µg/mL	>10 µg/mL

En la tabla anterior se observa una actividad superior del conjugado (AB/AZ) sobre el anticuerpo sin conjuar (AB).

### 3.6. EVALUACIÓN *IN VIVO* DEL CONJUGADO TRASTUZUMAB/AZETIDIN-2-ONA

Este estudio se realizó en ratones C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad, los cuales se clasificaron en cinco grupos de cuatro ratones; **grupo 1** control positivo de cáncer sin tratamiento, **grupo 2** control positivo de cáncer tratado con Trastuzumab, **grupo 3** control positivo de cáncer tratado con azetidin-2-ona, **grupo 4** control positivo de cáncer tratado con el conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona, **grupo 5** control negativo sin cáncer y sin tratamiento.

Se les indujo cáncer el día uno, esto a través de la inyección peritoneal de cinco millones de células B16F10 y se co-administró en las cajas 2 y 4 cinco millones de células MCF-7 esto para biodirigir la terapia hacia el tumor localizado. Se administró por punción en vena caudal el respectivo tratamiento, en el caso de las cajas 2 y 4 la dosis final fué de

10  $\mu\text{g/Kg}$ , en la caja 3 se administró 200  $\mu\text{L}$  a una concentración de 5  $\mu\text{M/Kg}$  del compuesto F-12-3t.

El crecimiento del tumor se determinó por el aumento del volumen y peso del mismo. El seguimiento del peso por día de cada uno de los ratones se muestra en las siguientes tablas.

**Tabla 31.** Grupo 1 sobrevivencia y peso de ratones con cáncer sin tratar.

Grupo 1	Días de sobrevivencia a partir de la induccion de tumor											
	1	8	15	16	17	18	19	20	21	22	23	29
AZUL	22 g	23.2 g	23.1 g	23.6 g	24.3 g	25.1 g	<b>XX 2.6</b>	XX	XX	XX	XX	XX
MORADO	24 g	26 g	26.8 g	26.9 g	27.1 g	<b>XX 2.44</b>	XX	XX	XX	XX	XX	XX
NARANJA	12 g	13.7 g	14.8 g	15.3 g	16.2 g	<b>XX 1.85</b>	XX	XX	XX	XX	XX	XX
NEGRO	23 g	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX

Como se puede notar en la tabla anterior los ratones fueron identificados mediante la coloración de la cola, el ratón negro no logró sobrevivir más de 8 días, debido a que presentó complicaciones en sus vías respiratorias, disminución de actividad, y no consumía alimento periódicamente; al realizar la necropsia se localizó una masa tumoral pequeña. Para los ratones marcados en azul, morado y naranja su tiempo de vida después de la administración de células neoplásicas fue de aproximadamente 17 días, y el crecimiento tumoral en los ratones fue de 2.60, 2.44 y 1.85 gramos, trayendo consigo la muerte de los mismos.

**Tabla 32.** Grupo 2 sobrevivencia y peso de ratones con cáncer tratados con Trastuzumab

Grupo 2	Días de sobrevivencia a partir de la induccion de tumor											
---------	---------------------------------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

	1	8	15	16	17	18	19	20	21	22	23	29
<b>AZUL</b>	12 g	15.3 g	17.4 g	17.8 g	<b>XX 2.39</b>	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
<b>MORADO</b>	10 g	12.2 g	15.9 g	16.2 g	16.7 g	16.9 g	17.3 g	<b>XX 1.23</b>	XX	XX	XX	XX
<b>NARANJA</b>	16 g	16.7 g	18.3 g	18.7g	<b>XX 1.65</b>	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
<b>NEGRO</b>	14 g	15.3 g	17.2 g	17.8 g	18.2 g	<b>XX 1.67</b>	XX	XX	XX	XX	XX	XX

Los ratones del grupo dos, fueron manejados de la misma manera en cuanto a la identificación. Los ratones tuvieron una sobrevivencia similar al grupo uno (sin tratamiento), a excepción del ratón morado que logro sobrevivir hasta el día 19. Siendo relevante que el peso y tamaño del tumor fue inferior a los del grupo uno.

**Tabla 33.** Grupo 3 sobrevivencia y peso de ratones con cáncer tratados con 3-aminoazetidin-2-ona (F-12-3t).

Grupo 3	Días de sobrevivencia a partir de la induccion de tumor											
	1	8	15	16	17	18	19	20	21	22	23	29
<b>AZUL</b>	18 g	17.1 g	19.2 g	19.2 g	19.3 g	19.5 g	19.7 g	<b>XX 2.38</b>	XX	XX	XX	XX
<b>MORADO</b>	18 g	17.8 g	18.4 g	18.5 g	18.9 g	<b>XX 1.44</b>	XX	XX	XX	XX	XX	XX
<b>NARANJA</b>	16 g	15.3 g	16.7 g	16.9 g	17.1 g	17.7 g	17.9 g	18.1 g	18.3 g	<b>XX 1.90</b>	XX	XX
<b>NEGRO</b>	18 g	17.8 g	18.5 g	18.7 g	18.9 g	19.2 g	19.8 g	20.1 g	20.4 g	<b>XX 2.23</b>	XX	XX

El grupo tres de ratones fue identificado con el mismo procedimiento de coloreado de la cola. El ratón morado no logró pasar la barrera de los 17 días (como sucede con los ratones sin tratamiento) pero los ratones naranja y negro presentaron una mejoría en sus actividades y alimentación hasta el día 21.

**Tabla 34.** Grupo 4 sobrevivencia y peso de ratones con cáncer tratados con Trastuzumab/azetidin-2-ona.

Grupo 4	Días de sobrevivencia a partir de la induccion de tumor											
	1	8	15	16	17	18	19	20	21	22	23	29
<b>AZUL</b>	18.0 g	18.7 g	18.4 g	18.0 g	18.2 g	18.1 g	18.5 g	18.7 g	18.5 g	18.9 g	18.4 g	<b>XX</b> <b>1.85</b>
<b>MORADO</b>	14.9 g	16.4 g	16.7 g	16.5 g	16.9 g	17.1 g	17.2 g	17.2 g	17.5 g	18.3 g	18.6 g	<b>XX</b> <b>1.69</b>
<b>NARANJA</b>	15.6 g	16.8 g	17.1 g	16.9 g	16.8 g	16.8 g	16.5 g	16.1 g	16.0 g	15.6 g	<b>XX</b> <b>0.49</b>	<b>XX</b>
<b>NEGRO</b>	14.5 g	15.0 g	15.2 g	15.2 g	15.8 g	16.2 g	16.8 g	17.2 g	17.7 g	18.1 g	<b>XX</b> <b>0.53</b>	<b>XX</b>

El grupo cuatro, en donde los ratones fueron tratados con Trastuzumab/azetidin-2-ona presentaron una notable mejoría en su calidad de vida, y sobre todo en la disminución del tamaño y peso del tumor, además de eso los ratones lograron sobrevivir un número de días mayor a los demás grupos.

**Tabla 35.** Grupo 5 sobrevivencia y peso de ratones sin cáncer, sin tratar (ratones normales).

Grupo 5	Días de sobrevivencia a partir de la induccion de tumor											
	1	8	15	16	17	18	19	20	21	22	23	29
<b>AZUL</b>	17 g	18 g	19 g	19 g	19 g	19 g	20 g	20 g	20 g	20 g	21 g	22 g
<b>MORADO</b>	16 g	17 g	18 g	18 g	18 g	18 g	19 g	19 g	19 g	19 g	20 g	21 g
<b>NARANJA</b>	17 g	18 g	19 g	19 g	19 g	19 g	20 g	20 g	20 g	20 g	21 g	22 g
<b>NEGRO</b>	17 g	18 g	19 g	19 g	19 g	19 g	20 g	20 g	20 g	20 g	21 g	22 g

El grupo cinco de ratones, fue identificado por colores donde fueron monitoreados diferentes comportamientos, hábitos, actividades, crecimiento, peso y a la misma edad del grupo experimental utilizado. La información recolectada fue esencial para determinar algunos patrones en el peso de los ratones.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Síntesis y caracterización

#### 4.1.1. Síntesis química de iminas aromáticas

Los 19 derivados de 3-amino-azetidin-2-ona, se obtuvieron a través de una vía de síntesis de tres pasos, que se ha convertido en una ruta de suma importancia química y biológica en el descubrimiento de nuevos fármacos con actividad anticancerígena. En la obtención de estas moléculas, se inició con la síntesis de iminas aromáticas a través de la reacción de cetona-amina en donde se hizo reaccionar un aldehído más una amina con diferentes sustituyentes como se muestra en la figura 16, los cuales tienen rendimientos muy altos que llegan a ser de hasta 95% de rendimiento final, esto debido a que presentan una amina primaria  $\text{NH}_2$ , permitiendo que la misma se aproxime al benzaldehído interactuando con un ataque nucleofílico que permite a la reacción química de altos rendimientos. Banik y cols<sup>82</sup> al realizar la síntesis estereoselectiva de iminas poliaromáticas mencionan que la reacción es relativamente sencilla y de gran uso en diferentes rutas sintéticas. La única excepción en el porcentaje de rendimiento es el compuesto F-10-1 con (56%), esto debido a su punto de fusión que está cercano a los  $36^\circ\text{C}$ , por lo tanto, cuando se realiza el reflujo en tolueno a temperaturas superiores a los  $150^\circ\text{C}$ , la interacción entre dichos reactivos de se incrementa, pero por su bajo punto de fusión del producto, al momento de cristalizar la temperatura del tolueno y las condiciones no favorecen un porcentaje de rendimiento adecuado.

De manera similar Ozlem Gungor y cols en el 2010<sup>83</sup> presentaron la síntesis de iminas aromáticas, en condiciones de reacción y metodología similares a las empleadas

en este proyecto, pero al usar como solvente el etanol obtuvieron rendimientos de aprox. 58%, además el grupo de investigación de Banik y cols en el 2003-2010<sup>21</sup> presentaron la síntesis de iminas aromáticas como reactivos de partida en la síntesis de azetidín-2-onas con un rendimiento de un 95%, bajo la estandarización de dicha reacción a reflujo en tolueno.

En la purificación de las iminas no fue requerido un método adicional, es suficiente lavar con hexano, y llevarlo a rotavapor, formando así los diferentes sólidos de las iminas, también conocidas como bases de Shiff. Dou y cols<sup>84</sup> sugieren en la patente US 7026472 que las iminas se preparen calentando cantidades equimolares de aldehído y la amina con una apropiada solución de benceno a reflujo en presencia de una pequeña cantidad de ácido *p*-tolueno-sulfónico en un sistema de Dean-Stark, seguido de la filtración de la solución, a través de un filtro de sílice gel, esto para eliminar la amina residual.

En antecedentes de nuestro grupo (Olazarán 2011<sup>39</sup>) se logró la estandarización de la caracterización de las iminas aromáticas por espectroscopia infrarrojo al detectar la presencia de bandas características en 1650 cm<sup>-1</sup>. Esta información fue determinante para poder caracterizar adecuadamente las iminas aromáticas del presente trabajo.

#### **4.1.2. Síntesis química de ftalamida-azetidín-2-ona**

En un principio se había propuesto sintetizar 12 derivados de ftalamido-azetidín-2-onas en sus dos configuraciones químicas isoméricas *cis* y *trans* dando un total de 24 compuestos, con base a las 12 iminas aromáticas obtenidas, pero la reacción de Staudinger no es específica para la obtención de los dos isómeros<sup>85</sup>, no se logró la obtención de los compuestos F-07-2c y F-08-2c.



La síntesis de ftalamida-azetidin-2-ona se realizó a través del mecanismo de reacción de Staudinger, y se logró mediante una metodología donde las condiciones de reacción son decisivas como; los tiempos, la temperatura, la presión, la humedad, la añadidura de los reactivos, la atmosfera en (N<sub>2</sub>) y la estereoquímica son fundamentales para la obtención de estos compuestos. Otros autores como Niu<sup>86</sup>, Banik<sup>20</sup> y Wang<sup>87</sup>, describen que las iminas aromáticas y las azetidin-2-onas presentan un gran reto en la síntesis y purificación debido a que se producen los diferentes isómeros y por lo tanto, presentan una alta formación de mezclas racémicas.

Cabe mencionar que en el segundo paso de la ruta de síntesis para la obtención de 3-amino-azetidin-2-ona, los compuestos sintetizados fueron obtenidos con rendimientos que oscilan entre un 60 y 70%. Al realizar la purificación para la obtención de los derivados *cis* y *trans*-ftalamida-azetidin-2-ona, todos los compuestos en configuración *trans* fueron obtenidos, pero en el caso de la configuración *cis*, los compuestos F-11-2c y F-12-2c, no se consiguieron bajo estas condiciones, lo cual sugiere que debido a sus grupos poliaromáticos podrían estar generando un impedimento estérico sobre esta configuración al estar presentes sobre el mismo plano.

En la purificación de dichos compuestos, se aprovechó la cromatografía en columna con una fase estacionaria de sílice gel, la cual fue empaquetada en una columna de 250 mL, usando una fase móvil en gradiente de Hexanos/Acetato de etilo, a un flujo constante de 10 mL por minuto, avanzando en la polaridad de 2% por fracción de 200 mL hasta llegar al 100%. Los rendimientos finales obtenidos en la purificación de los compuestos derivados de ftalamida-azetidin-2-ona en configuración *cis* y *trans*, son aceptables debido a la complejidad de los mismos. Esto se confirma de acuerdo a los

reportes de Bandyopadhyay y cols<sup>45</sup>, que muestran datos similares con rendimientos altos para compuestos poliaromáticos preferentemente en configuración *trans*.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$ , ayudaron a distinguir las diferencias entre los compuestos F-01-2t y F-01-2c. Estos compuestos son isómeros, y su única diferencia es en el acomodo de los radicales localizados en posición tres y cuatro del anillo de azetidin-2-ona, cambiando su constante de acoplamiento entre los hidrógenos 3 y 4 de la azetidin-2-ona. Jarrahpour y cols<sup>88,89</sup>, mencionan que la estereoquímica de compuestos de azetidin-2-onas en configuraciones *cis* se deduce por sus constantes de acoplamiento igual o mayor a 4.0 Hz de los protones H-3 y H-4; para el caso de los compuestos en configuración *trans* la constante de acoplamiento es igual o menor a 3.0 Hz.

#### 4.1.3. Síntesis química de 3-amino-azetidin-2-ona

En el proceso de la ruta de síntesis para la obtención de los compuestos 3-amino-azetidin-2-ona, se requirió de los compuestos obtenidos anteriormente (ftalamida-azetidin-2-ona), los cuales a través de un ataque nucleofílico de la etilendiamina sobre el radical ftalamida, producen compuestos de 3-amino-azetidin-2-ona. El compuesto F-09-3c presentó dificultades debido a la mezcla racémica con su isómero, lo que ocasionó que no pudiera continuarse con su caracterización. Los rendimientos fueron considerablemente altos debido a que estos compuestos fueron manejados de manera separada de sus isómeros purificados e identificados en el paso anterior. La purificación de los compuestos 3-amino-azetidin-2-ona se realizó por cromatografía en columna de sílice gel. Éstos fueron identificados por espectroscopía de infrarrojo, a través de la banda característica del grupo amina ( $\text{NH}_2$ ) en la región de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , no obstante, esta

señal por sí sola no permite la confirmación plena de la identidad de los compuestos, por lo que es necesaria también su confirmación por RMN  $^1\text{H}$  de las 3-amino-azetidin-2-ona, al localizar los picos de cada protón del anillo de azetidin-2-ona en aprox. 4 ppm como se muestra en la figura 27.

#### 4.2. Acoplamiento molecular de derivados de 3-amino-azetidin-2-ona

Los derivados 3-amino-azetidin-2-ona, se realizó un ensayo *in silico*, en un modelo de tubulina construido específicamente para este fin, con ayuda de los programas Autodock vina y Chimera, y la base de datos PDB (Banco de Datos de Proteínas)<sup>90</sup>. Esta proteína que representa la unidad fundamental de los microtúbulos ha sido el foco de atención y el modelo de batalla para una gran cantidad de fármacos anticancerígenos cuyo blanco terapéutico es la tubulina. Se han encontrado a la fecha tres regiones específicas del dímero de tubulina donde se unen diferentes tipos de fármacos que son el sitio de unión de los derivados del taxol, el sitio de unión de los derivados de la vinca y el que es de nuestro interés, el sitio de unión de la colchicina<sup>91</sup> (Figura 27), que de los 3 mencionados este último es para el que no existen alternativas farmacológicas sugeridas. Calculamos mediante ensayos de acoplamiento molecular, las constantes energéticas para la unión a dichos sitios de las moléculas sintetizadas, observando que las mismas presentan mejor acoplamiento molecular en el sitio de unión de la colchicina en la  $\beta$ -tubulina.

#### 4.3. Evaluación biológica anticancerígena de los compuestos derivados de 3-amino-azetidin-2-ona

La evaluación biológica *in vitro* para determinar la actividad anticancerígena y citotóxica de los compuestos derivados de 3-amino-azetidin-2-ona en configuración *cis*

y *trans*, se realizó sobre tres líneas celulares cancerígenas seleccionadas: SiHa, B16F10 y K562, además se realizó un ensayo en la línea celular Chang que proviene de hepatocitos humanos (células del Hígado). Este estudio se realizó con la finalidad de conocer la concentración inhibitoria media máxima (CI<sub>50</sub>), la cual fue determinada a partir de los resultados obtenidos de la viabilidad celular. Las células al ser tratadas a diferentes concentraciones micromolares de los derivados de 3-amino-azetidin-2-ona así como los controles colchicina y podofilotoxina fueron cuantificadas después de ser sometidas al ensayo WST-1 para identificar las células viables y consecuentemente el daño producido por los compuestos en estudio al igual que por los controles. La viabilidad celular es inversamente proporcional a la toxicidad producida (en células cancerígenas es conocida como actividad anticancerígena y en células normales como citotoxicidad).

La técnica de WST-1 ha sido un referente importante para determinar la actividad anticancerígena de nuevas moléculas quimioterapéuticas y fotodinámicas. Arredondo y cols<sup>92</sup>, determinaron la actividad anticancerígena a través de este ensayo, de compuestos derivados de porfirinas en células Hela, como modelo para terapia fotodinámica. Mahidhar y cols<sup>93</sup>, realizaron una comparación de la actividad anticancerígena por WST-1 del Resveratrol en configuración *cis* y *trans* en células MCF-7, encontrando marcadas diferencias en los valores de actividad anticancerígena entre ambos isómeros.

Otro método empleado en la determinación de la actividad anticancerígena de derivados de azetidin-2-ona que se sustenta en el mismo principio es el MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), que ha sido utilizado por Tripodi y

cols<sup>94</sup> para encontrar la actividad anticancerígena de derivados 1,4-diaril-azetidin-2-ona, sintetizadas y purificadas en sus dos configuraciones *cis* y *trans*.

#### 4.3.1. Actividad citotóxica en células Chang

Los compuestos que presentaron actividad citotóxica en células Chang fueron F-01-3t, F-08-3t, F-11-3t y F-12-3t para los compuestos en configuración *trans* mientras que los compuestos en configuración *cis* fueron F-01-3c, F-02-3c, F-03-3c, F-04-3c, F-05-3c, F-06-3c, F-10-3c. Al hacer un comparativo entre los compuestos en ambas configuraciones, puede observarse que los compuestos en configuración *cis* son mayormente activos frente a sus contrapartes *trans*. En el caso de los compuestos poliaromáticos (F-11-3t y F-12-3t) su actividad fue superior que sus homólogos monoaromáticos.

Los compuestos monoaromáticos en configuración *cis* de los derivados 3-amino-azetidin-2-ona son más citotóxicos frente a células de Chang que sus contrapartes isoméricas en *trans*.

#### 4.3.2. Actividad anticancerígena en células SiHa

Los compuestos monoaromáticos en configuración *cis* son prácticamente dos veces más activos que sus contrapartes *trans*. Los compuestos F-06-3t y F-06-3c mostraron un  $CI_{50}$  de 4.79 y 2.34  $\mu M$  respectivamente, lo que demuestra que un cambio en la configuración de la estructura puede tener una repercusión importante en su actividad anticancerígena<sup>95</sup>. Así mismo se puede realizar un comparativo entre el compuesto monoaromático más activo (F-08-3t) frente al compuesto poliaromático (F-12-3t) con un  $CI_{50} = 3.23$  y 1.39  $\mu M$  respectivamente, observando que el compuesto F-12-3t es dos veces mayor que el compuesto F-06-3c. Estos hallazgos han sido

previamente confirmados por Bandyopadhyay y cols<sup>45</sup>, quien reporta que los compuestos poliaromáticos son mejores anticancerígenos que los compuestos monoaromáticos.

#### 4.3.3. Actividad anticancerígena en células B16F10

Como se mencionó anteriormente, en este caso para las células de melanoma, los derivados monoaromáticos de 3-amino-azetidin-2-ona en configuración *cis* son mejores que sus contrapartes en configuración *trans*. Los resultados de F-06-3c y F-06-3t con un  $CI_{50}$  de 0.7 y 5.79  $\mu M$  respectivamente, demuestran que el compuesto en configuración *cis* es casi ocho veces más activo que su contraparte *trans*.

Por otro lado, al comparar dos compuestos monoaromáticos, el F-06-3c y F-08-3t que a pesar de no ser isómeros presentan la cualidad del anillo aromático único, puede observarse que el compuesto *cis* es dos veces mejor anticancerígeno que el F-08-3t que es el compuesto *trans*.

Tal como lo reporta Greene y cols<sup>34</sup>, los compuestos derivados de azetidin-2-ona con mayor actividad suelen ser los compuestos en configuración *cis*, lo que se confirma en el presente estudio.

#### 4.3.4. Actividad anticancerígena en células K562

Los compuestos monoaromáticos F-03-3c y F-10-3c presentaron para células de linfoma mieloide un  $CI_{50}$  de 6.14 y 6.86  $\mu M$ , siendo más activos como anticancerígenos que sus contrapartes en *trans* F-03-3t y F-10-3t debido a que su  $CI_{50}$  supera 10.0  $\mu M$ . Sin embargo, estos compuestos son superados por el compuesto poliaromático F-11-3t, el cual es hasta seis veces más activo al presentar un  $CI_{50} = 1.15 \mu M$ .

En el análisis *in silico* el compuesto F-12-3t presenta una unión sobre los sitios de unión de la colchicina y la vinca, con una afinidad molecular superior a los controles colchicina y vinblastina. En el caso de la actividad anticancerígena el compuesto F-12-3t presentó un  $CI_{50}$  de SiHa 1.39  $\mu$ M, B16F10 1.55  $\mu$ M y K562 3.65  $\mu$ M. Por tal motivo el compuesto F-12-3t fue seleccionado para conjugarse al anticuerpo monoclonal (Trastuzumab).

En el caso de la actividad anticancerígena en la línea celular K562 el conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona presentan un  $IC_{50}$  de 2.5  $\mu$ g/mL, mientras que Trastuzumab es de tan solo 10  $\mu$ g/mL. En la línea celular MCF-7 el conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona presentó una actividad anticancerígena con un  $IC_{50}$  de 0.105  $\mu$ g/mL, así mismo el Trastuzumab sin conjugar presenta una actividad anticancerígena de un  $IC_{50}$  de 0.364  $\mu$ g/mL. En el análisis de la actividad citotóxica en células de Chang, las células no fueron afectadas por el anticuerpo monoclonal, y de la misma forma, por el conjugado de Trastuzumab/azetidin-2ona.

Por tal motivo se demuestra una actividad superior del conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona sobre el anticuerpo sin conjugar (Trastuzumab).

La actividad biológica anticancerígena *in vivo* se clasificaron en cinco grupos; El grupo 1 control positivo de cáncer sin tratamiento, su tiempo de vida después de la administración de células neoplásicas fue de aproximadamente 17 días, y el crecimiento tumoral en los ratones fue de 2.60, 2.44 y 1.85 gramos. El grupo 2 control positivo de cáncer tratado con Trastuzumab, los ratones tuvieron una sobrevivencia similar al grupo uno (sin tratamiento). El grupo 3 control positivo de cáncer tratado con azetidin-2-ona, dos ratones presentaron una mejoría en sus actividades y alimentación hasta el día 21. El

---

grupo 4 control positivo de cáncer tratado con el conjugado Trastuzumab/azetidin-2-ona, presentaron una notable mejoría en su calidad de vida, y sobre todo en la disminución del tamaño y peso del tumor, además de eso los ratones lograron sobrevivir un número de días mayor a los demás grupos de hasta 29 días. El grupo 5 control negativo sin cáncer y sin tratamiento. La información recolectada fue esencial para determinar algunos patrones en el peso de los ratones sanos.



---

## 5. CONCLUSIONES

- Se determinó por espectrometría de infrarrojo y resonancia magnética nuclear de protón y carbono 13, la síntesis de 19 nuevos derivados de 3-amino-azetidin-2-ona, 7 en configuración *cis* y 12 en configuración *trans*.
- Se determinaron las posibles interacciones químicas sobre el receptor de la beta-tubulina humana. Encontrando que el compuesto F-12-3t presenta una mayor afinidad sobre el sitio de unión de la colchicina.
- Se encontró que el compuesto F-12-3t presenta la mayor actividad anticancerígena.
- Se realizó la conjugación del complejo Trastuzumab/azetidin-2-ona, a partir del compuesto F-12-5t.
- Se evaluó *in vitro* la actividad anticancerígena del conjugado trastuzumab/azetidin-2-ona (F-12-5t) presentando una  $CI_{50}$  de 0.105 ug/ml que es menor a la del anticuerpo solo (0.3642 ug/ml).
- La actividad anticancerígena *in vivo* del conjugado después del desarrollo de tumor, produjo una mayor supervivencia que el anticuerpo y el compuesto F-12-5t por separado en modelos murinos.
- Se acepta la hipótesis planteada.

---

## 6. REFERENCIAS

- 
- 1.- Organización Mundial de la Salud (2015). Nota descriptiva del Cáncer. Revisado en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>. Febrero del 2015.
  - 2.- American Cancer Society, Surveillance Research, (2015). Data are collected by cancer registries participating in the National Cancer Institute's SEER program and the Centers for Disease Control and Prevention's National Program of Cancer Registries.
  - 3.- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2015). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer datos nacionales. Revisado en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2780&ep=50>. Febrero del 2015.
  4. - Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman. "La Célula". Marban Libros, S.L. Ed 1. 2006. Pág. 631-634.
  - 5.- Goodman Gilman A. (2002) Las bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial MC Graw Hill. Editores Hardman y Limbird. Sección IX. Páginas 1397-1476.
  - 6.- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69-90.
  - 7.- Doll, R., & Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute*, 66(6), 1192-1308.

- 
- 8.- DeSantis, C. E., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Siegel, R. L., Stein, K. D., Kramer, J. L., & Jemal, A. (2014). Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(4), 252-271.
- 9.- Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Yang, J. C., Morgan, R. A., & Dudley, M. E. (2008). Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 8(4), 299-308.
- 10.- Phillips, G. D. L., Li, G., Dugger, D. L., Crocker, L. M., Parsons, K. L., Mai, E., & Wong, W. L. T. (2008). Targeting HER2-positive breast cancer with Trastuzumab-DM1, an antibody–cytotoxic drug conjugate. *Cancer research*, 68(22), 9280-9290.
- 11.- Teicher, B. A., & Chari, R. V. (2011). Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. *Clinical Cancer Research*, 17(20), 6389-6397.
- 12.- Ricart, A. D. (2011). Antibody-drug conjugates of calicheamicin derivative: gemtuzumab ozogamicin and inotuzumab ozogamicin. *Clinical Cancer Research*, 17(20), 6417-6427.
- 13.- Younes, A., Bartlett, N. L., Leonard, J. P., Kennedy, D. A., Lynch, C. M., Sievers, E. L., & Forero-Torres, A. (2010). Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas. *New England Journal of Medicine*, 363(19), 1812-1821.
- 14.- Beck, A., Senter, P. D., & Chari, R. J. (2011, July). World Antibody Drug Conjugate Summit Europe: February 21–23, 2011; Frankfurt, Germany. In *MAbs* (Vol. 3, No. 4, pp. 331-337). Taylor & Francis.

- 
- 15.- Zhu, X., Bidlingmaier, S., Hashizume, R., James, C. D., Berger, M. S., & Liu, B. (2010). Identification of internalizing human single-chain antibodies targeting brain tumor sphere cells. *Molecular cancer therapeutics*, 9(7), 2131-2141.
- 16.- Ivanov, A., Beers, S. A., Walshe, C. A., Honeychurch, J., Alduaij, W., Cox, K. L., & Erenpreisa, J. (2009). Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *The Journal of clinical investigation*, 119(8), 2143-2159.
- 17.- Heider, K. H., Kiefer, K., Zenz, T., Volden, M., Stilgenbauer, S., Ostermann, E., & Müller, S. (2011). A novel Fc-engineered monoclonal antibody to CD37 with enhanced ADCC and high proapoptotic activity for treatment of B-cell malignancies. *Blood*, 118(15), 4159-4168.
- 18.- Younes, A. (2011). CD30-targeted antibody therapy. *Current opinion in oncology*, 23(6), 587-593.
- 19.- Wilson, N. S., Yang, B., Yang, A., Loeser, S., Marsters, S., Lawrence, D., & Ross, S. (2011). An Fc $\gamma$  receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated target-receptor signaling in cancer cells. *Cancer cell*, 19(1), 101-113.
- 20.- Spector, N. L., & Blackwell, K. L. (2009). Understanding the mechanisms behind Trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(34), 5838-5847.
- 21.- Davoli, A.; Hocevar, B.; Brown, T. (2010) Progression and treatment of HER2-positive breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 65:611–623.

- 
- 22.- Banik, I.; Becker, F.; Banik, B.K. (2003). Stereoselective synthesis of  $\beta$ -lactams with polyaromatic imines: entry to new and novel anticancer agents. *J. Med Chem.* 46 (1):12-15.
- 23.- Banik, B.K.; Becker, F.; Banik, I. (2004). Synthesis of anticancer  $\beta$ -lactams: mechanism of action. *Bioorg Med Chem.* 12: 2523-2528.
- 24.- Banik, B.K.; Becker, F.; Banik, I. (2010). Asymmetric synthesis of anticancer  $\beta$ -lactams via Staudinger reaction: utilization of chiral ketene from carbohydrate. *Eur J Med Chem.* 45:845–848.
- 25.- Banik, B.K.; Lecea, B.; Arrieta, A.; Cozar, A.; Cossio, F. (2007) On the Stereodivergent Behavior Observed in the Staudinger Reaction between Methoxyketene and (E)-N-Benzylidenearyl Amines. *Angew. Chem.* 46, 3028 –3032.
- 26.- Frezza, M.; Garay, J.; Chen, D.; Cui, C.; Turos, E.; Dou, P.Q. (2008). Induction of tumor cell apoptosis by a novel class of N-thiolated  $\beta$ -lactam antibiotics with structural modifications at N1 and C3 of the lactam ring. *Int J Mol Med.* 21: 689-695.
- 27.- Carr, M.; Greene, L.M.; Knox, J.S.; Lloyd, D.G.; Zisterer, D.M.; Meegan, M.J. (2010). Lead identification of conformationally restricted  $\beta$ -lactam type combretastatin analogues: Synthesis, antiproliferative activity and tubulin targeting effects. *Eur J Med Chem.* 45:5752-5766.
- 28.- O’Boyle, N.M.; Carr, M.; Greene, L.M.; Bergin, O.; Nathwani, S.M.; McCabe, T.; Lloyd, D.G.; Zisterer, D.M.; Meegan, M.J. (2010). Synthesis and Evaluation of Azetidinone Analogues of Combretastatin A-4 as Tubulin Targeting Agents. *Eur J Med Chem.* 53, 8569–8584.

- 
29. Grigg, R.; Thornton, J.; Long-He. (1999) Synthesis of Novel 4-(S-Pyrrolidinyl)-B-Lactams. *Tetrahedron* 55 13841-13866.
- 30.- O'Boyle, N.M.; Carr, M.; Greene, L.M.; Keely, N.O.; Knox, A.J.; McCabe, T.; Lloyd, D.G.; Zisterer, D.M.; Meegan, M.J. (2011). Synthesis, biochemical and molecular modelling studies of antiproliferative azetidinones causing microtubule disruption and mitotic catastrophe. *Eur J Med Chem.* 46 4595-4607.
- 31.- O'Boyle, N.; Knox, A.; Price, T.; Williams, C.; Zisterer, D.; Lloyd, D.; Meegan, M. (2011) Lead identification of b-lactam and related imine inhibitors of the molecular chaperone heat shock protein 90. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19, 6055–6068.
- 32.- O'Boyle, N.M.; Carr, M.; Greene, L.M.; Bergin, O.; Fichet, J.; McCabe, T.; Lloyd, D.G.; Zisterer, D.M.; Meegan, M.J. (2011) Synthesis, evaluation and structural studies of antiproliferative tubulin-targeting azetidin-2-ones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19, 2306–2325.
- 33.- Greene, L.; Nathwani, S.; Bright, S.; Fayne, D.; Croke, A.; Gagliardi, M.; McElligott A.; O'Connor, L.; Carr, M.; Keely, N.; O'Boyle, N.M.; Carroll, P.; Sarkadi, B.; Conneally, E.; Lloyd, D.G.; Lawler, M.; Meegan, M.; Zisterer, D.M. (2010) The Vascular Targeting Agent Combretastatin-A4 and a Novel cis-Restricted B-Lactam Analogue, CA-432, Induce Apoptosis in Human Chronic Myeloid Leukemia Cells and Ex Vivo Patient Samples Including Those Displaying Multidrug Resistance. *JPET* 335:302–313.
- 34.- Greene, L.M.; Carr, M.; Keeley, N.; Lawler, M.; Meegan, M.; Zisterer, D. (2011) BubR1 is required for the mitotic block induced by combretastatin-A4 and a novel cis-restricted  $\beta$ -lactam analogue in human cancer cells. *Molecular medicine* 27: 715-723.

- 
- 35.- Greene, L.M.; O'Boyle, N.M.; Nolan, D.; Meegan, M.; Zisterer, D (2012) The vascular targeting agent Combretastatin-A4 directly induces autophagy in adenocarcinoma-derived colon cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 84, 612–624.
- 36.- Olazarán, F. E. (2011). Síntesis y evaluación *in silico* de la actividad biológica de nuevos derivados de *N*-(4-metoxifenil)-3-fenoxi-azetidin-2-ona con potencial actividad anticancerígena. Tesis de Licenciatura. UAMRA. UAT. Cd. Reynosa, Tamaulipas, México.
- 37.- Pérez, A. M. (2011). Síntesis y evaluación *in silico* de la actividad biológica de nuevos derivados de azetidin-2-onas con potencial actividad anticancerígena. Tesis de Licenciatura. UAMRA. UAT. Cd. Reynosa, Tamaulipas, México.
- 38.- Olazarán, F. E. (2013) Evaluación del efecto celular y molecular de derivados de azetidin-2-onas sobre líneas celulares cancerígenas. Tesis de Maestría. FCQ. UANL. Monterrey, Mexico.
- 39.- Olazaran, F. E., Rivera, G., Perez-Vazquez, A. M., Morales-Reyes, C. M., Segura-Cabrera, A., & Balderas-Renteria, I. (2016). Biological Evaluation in vitro and in silico of Azetidin-2-one Derivatives as Potential Anti-Cancer Agents. *ACS Medicinal Chemistry Letters*.
- 40.- Reichert J.;Dhimolea E.; (2012) Foundation review: The future of antibodies as cancer drugs. *Drug Discovery Today*. 17, 17/18.
- 41.- Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., & Cameron, D. (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1659-1672.

- 
- 42.- Romond, E. H., Perez, E. A., Bryant, J., Suman, V. J., Geyer Jr, C. E., Davidson, N. E., & Swain, S. M. (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1673-1684.
- 43.- Phillips, G. D. L., Li, G., Dugger, D. L., Crocker, L. M., Parsons, K. L., Mai, E., & Wong, W. L. T. (2008). Targeting Her2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody–cytotoxic drug conjugate. *Cancer research*, 68 (22), 9280-9290.
- 44.- Barok, M.; Tanner, M.; Köninki K.; Isola, J. (2011) Trastuzumab-DM1 causes tumour growth inhibition by mitotic catastrophe in Trastuzumab resistant breast cancer cells *in vivo*. *Breast Cancer Research*. 13:46.
- 45.- Casi, G.; Neri, D. (2012) Antibody–drug conjugates: Basic concepts, examples and future perspectives, *Controlled Release*, 161, 422-428.
- 46.- Lucía G. Cantú Cárdenas, María del Rosario González González. Nomenclatura de Compuestos Orgánicos, Manual de Ejercicios. Editado por: Universidad Autónoma de Nuevo León, 2009. ISBN 978-9960-6672-41-5.
- 47.- Maldague, X. (1994). *Infrared methodology and technology*. CRC.
- 48.- Smith, M. E., & van Eck, E. R. (1999). Recent advances in experimental solid state NMR methodology for half-integer spin quadrupolar nuclei. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 34(2), 159-201.
- 49.- Bandyopadhyay, D., Cruz, J., & Banik, B. K. (2012). Novel synthesis of 3-pyrrole substituted  $\beta$ -lactams via microwave-induced bismuth nitrate-catalyzed reaction. *Tetrahedron*, 68(52), 10686-10695.



- 
- 50.- Bandyopadhyay, D.; Rivera, G.; Salinas I.; Aguilar, H.; Banik B.K (2010) Remarkable Iodine-Catalyzed Synthesis of Novel Pyrrole-Bearing *N*-Polyaromatic  $\beta$ -Lactams. *Molecules*, 15, 1082-1088.
- 51.- Bandyopadhyay, D.; Cruz, J.; Yadav, R.; Banik, B.K (2012). An Expeditious Iodine-Catalyzed Synthesis of 3-Pyrrole-substituted 2-Azetidinones. *Molecules*, 17, 11570-11584.
- 52.- O'Boyle, N. M., Greene, L. M., Keely, N. O., Wang, S., Cotter, T. S., Zisterer, D. M., & Meegan, M. J. (2013). Synthesis and biochemical activities of antiproliferative amino acid and phosphate derivatives of microtubule-disrupting  $\beta$ -lactam combretastatins. *European journal of medicinal chemistry*, 62, 705-721.
- 53.- Sapra, P., Hooper, A. T., O'Donnell, C. J., & Gerber, H. P. (2011). Investigational antibody drug conjugates for solid tumors. *Expert opinion on investigational drugs*, 20(8), 1131-1149.
- 54.- Kamath, A. V., & Iyer, S. (2015). Preclinical pharmacokinetic considerations for the development of antibody drug conjugates. *Pharmaceutical research*, 32(11), 3470-3479.
- 55.- Sun, X., & Erickson, H. (2013). Studies on the metabolism of antibody–drug conjugates. In *Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins* (pp. 297-316). Springer New York.
- 56.- Hay, R. J.; Caputo, J. L.; Macy, M. L. (1992), ATCC Quality Control Methods for Cell Lines. 2nd edition, Published by ATCC.

- 
- 57.- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 16;65(1-2):55-63.
- 58.- Jaeschke H., et al. (1998). Activation of Caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF- $\alpha$ -induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. *J. Immunol*. 160 (7):3480-3486.
- 59.- Golay, J.; Introna, M. (2012) Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: Promises and pitfalls of *in vitro* and *in vivo* assays. *Biochemistry and Biophysics* 526 (2012) 146–153.
- 60.- De Aluja, A. S. (2002). Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac Med Mex*, 138(3), 295-8.
- 61 58.- John McMurry. (2012). *Química orgánica*. Cengage Learning Editores.
- 62.- Saxon, E., & Bertozzi, C. R. (2000). Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science*, 287(5460), 2007-2010.
- 63.- Mukaiyama, T., Banno, K., & Narasaka, K. (1974). New cross-aldol reactions. Reactions of silyl enol ethers with carbonyl compounds activated by titanium tetrachloride. *Journal of the American Chemical Society*, 96(24), 7503-7509.
- 64.- Coantic, S., Mouysset, D., Mignani, S., Tabart, M., & Stella, L. (2007). Stereoselective synthesis of trans-disubstituted- $\beta$ -lactams from N-phenylsulfenylimines. *Tetrahedron letters*, 48(24), 4301-4303.
- 65.- Agresti, A., & Kateri, M. (2011). *Categorical data analysis* (pp. 206-208). Springer Berlin Heidelberg.

- 
- 66.- Stuart, B. (2005). *Infrared spectroscopy*. John Wiley & Sons, Inc..
- 67.- Skoog, D. A., Holler, F., Stanley, R. D. A., Aucejo, M., Estellés, A., Hernández, M. H., & Ruiz, I. G. (2008). *Principios de análisis instrumental* (No. 543.4/. 5). Cengage Learning.
- 68.- Shaikh, A. L., Esparza, O., & Banik, B. K. (2011). An Efficient Synthesis of Optically Active trans-(3R, 4R)-3-Acetoxy-4-aryl-1-(chrysen-6-yl) azetidin-2-ones Using (+)-Car-3-ene as a Chiral Auxiliary. *Helvetica Chimica Acta*, 94(12), 2188-2193.
- 69.- Da, C., Telang, N., Barelli, P., Jia, X., Gupton, J. T., Mooberry, S. L., & Kellogg, G. E. (2011). Pyrrole-based antitubulin agents: two distinct binding modalities are predicted for C-2 analogues in the colchicine site. *ACS medicinal chemistry letters*, 3(1), 53-57.
- 70.- Sutton, J. C., Bolton, S. A., Davis, M. E., Hartl, K. S., Jacobson, B., Mathur, A., & Bisacchi, G. S. (2004). Solid-phase synthesis and SAR of 4-carboxy-2-azetidinone mechanism-based tryptase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 14(9), 2233-2239.
- 71.- Greene, T. F., Wang, S., Greene, L. M., Nathwani, S. M., Pollock, J. K., Malebari, A. M., & Meegan, M. J. (2015). Synthesis and biochemical evaluation of 3-Phenoxy-1, 4-diarylazetidin-2-ones as tubulin-targeting antitumor agents. *Journal of medicinal chemistry*, 59(1), 90-113.
- 72.- Romaniello, R., Tonelli, A., Arrigoni, F., Baschiroto, C., Triulzi, F., Bresolin, N., & Borgatti, R. (2012). A novel mutation in the  $\beta$ -tubulin gene TUBB2B associated with complex malformation of cortical development and deficits in axonal guidance. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 54(8), 765-769.

- 
- 73.- Mills, N. (2006). ChemDraw Ultra 10.0 CambridgeSoft, 100 CambridgePark Drive, Cambridge, MA 02140. [www.cambridgesoft.com](http://www.cambridgesoft.com). Commercial Price: 1910fordownload, 2150 for CD-ROM; Academic Price: 710fordownload, 800 for CD-ROM. *Journal of the American Chemical Society*, 128(41), 13649-13650.
- 74.- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of cheminformatics*, 4(1), 1.
- 75.- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785-2791.
- 76.- Lu, Y., Chen, J., Wang, J., Li, C. M., Ahn, S., Barrett, C. M., ... & Miller, D. D. (2014). Design, synthesis, and biological evaluation of stable colchicine binding site tubulin inhibitors as potential anticancer agents. *Journal of medicinal chemistry*, 57(17), 7355-7366.
- 77.- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- 78.- Kim, N. D., Park, E. S., Kim, Y. H., Moon, S. K., Lee, S. S., Ahn, S. K., ... & Kim, K. H. (2010). Structure-based virtual screening of novel tubulin inhibitors and their characterization as anti-mitotic agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(19), 7092-7100.

- 
- 79.- Jeong, S. C., Kim, S. M., Jeong, Y. T., & Song, C. H. (2013). Hepatoprotective effect of water extract from *Chrysanthemum indicum* L. flower. *Chinese Medicine*, 8, 7. <http://doi.org/10.1186/1749-8546-8-7>
- 80.- Nebija, D., Noe, C. R., Urban, E., & Lachmann, B. (2014). Quality control and stability studies with the monoclonal antibody, trastuzumab: application of 1D-vs. 2D-gel electrophoresis. *International journal of molecular sciences*, 15(4), 6399-6411.
- 81.- Wilkins, M.R.; Lindskog, I.; Gasteiger, E.; Bairoch, A.; Sanchez, J.C.; Hochstrasser, D.F.; Appel, R.D. Detailed peptide characterization using peptide mass—A world-wide web accessible tool. *Electrophoresis* **1997**, 18, 403–408.
- 82.- Banik, B.K.; Becker, F.; Banik, I. (2005). Stereocontrolled synthesis of anticancer  $\beta$ -lactams via the Staudinger reaction. *Bioorg Med Chem*. 13:3611 3622.
- 83.- Güngör, Ö., & Gürkan, P. (2010). Synthesis and spectroscopic properties of novel asymmetric Schiff bases. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 77(1), 304-311.
- 84.- Dou, Q. P., Turos, E., & Smith, D. M. (2006). U.S. Patent No. 7,026,472. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- 85.- Pagadala, R., Meshram, J. S., Chopde, H. N., & Jetti, V. (2010). Synthesis of novel bis ( $\beta$ -Lactams) from bis (ketene) and imines. *Int J Chem Tech Res*, 2(3), 1581-1585.
- 86.- Srirajan, V., Deshmukh, A. R. A. S., Puranik, V. G., & Bhawal, B. M. (1996). Asymmetric synthesis of  $\alpha$ -hydroxy acids via  $\beta$ -Lactams. *Tetrahedron: Asymmetry*, 7(9), 2733-2738.

- 
- 87.- Wang, Y., Zhang, H., Huang, W., Kong, J., Zhou, J., & Zhang, B. (2009). 2-Azetidinone derivatives: Design, synthesis and evaluation of cholesterol absorption inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 44(4), 1638-1643.
- 88.- Jarrahpour, A., & Nazari, M. (2015). Synthesis of some new polycyclic aromatic monocyclic [Beta]-lactams. *Iranian Journal of Science and Technology*, 39(A3), 259.
- 89.- Jarrahpour, A., Ebrahimi, E., Sinou, V., Latour, C., & Brunel, J. M. (2014). Diastereoselective synthesis of potent antimalarial cis- $\beta$ -lactam agents through a [2+ 2] cycloaddition of chiral imines with a chiral ketene. *European journal of medicinal chemistry*, 87, 364-371.
- 90.- RCSB, P. (2016). Protein Data Bank. *A resource for studying biological macromolecules* [www.pdb.org](http://www.pdb.org).
- 91.- Da, C., Telang, N., Barelli, P., Jia, X., Gupton, J. T., Mooberry, S. L., & Kellogg, G. E. (2011). Pyrrole-based antitubulin agents: two distinct binding modalities are predicted for C-2 analogues in the colchicine site. *ACS medicinal chemistry letters*, 3(1), 53-57.
- 92.- Arredondo-Espinoza, E., López-Cortina, S., & Balderas-Rentería, I. (2014). Synthesis and Photodynamic Activity of 5, 10, 15-Tris (p-chlorophenyl)-20-(2-hydroxy-3-methoxyphenyl)-21H, 23H-porphyrin. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 58(4), 369-373.
- 93.- Yenugonda, V. M., Kong, Y., Deb, T. B., Yang, Y., Riggins, R. B., & Brown, M. L. (2012). Trans-resveratrol boronic acid exhibits enhanced anti-proliferative activity on

---

estrogen-dependent MCF-7 breast cancer cells. *Cancer biology & therapy*, 13(10), 925-934.

94.- Tripodi, F., Pagliarin, R., Fumagalli, G., Bigi, A., Fusi, P., Orsini, F., & Coccetti, P. (2012). Synthesis and biological evaluation of 1, 4-diaryl-2-azetidinones as specific anticancer agents: activation of adenosine monophosphate activated protein kinase and induction of apoptosis. *Journal of medicinal chemistry*, 55(5), 2112-2124.

95.- Kamath, A., & Ojima, I. (2012). Advances in the chemistry of  $\beta$ -lactam and its medicinal applications. *Tetrahedron*, 68(52), 10640-10664.

## 6.1. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO



**Fabián Eliseo Olazarán Santibáñez**

Candidato para obtener el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Farmacia

**Tesis:** “Síntesis y evaluación biológica *in vitro* e *in vivo* de nuevos derivados de azetidin-2-ona conjugados con un anticuerpo monoclonal Anti-Her-2”

**Campo de estudio:** Investigación Farmacéutica

**Biografía:** Nacido en Cd. Victoria Tamaulipas, México, el 11 de octubre de 1988, hijo de Santos Olazarán Zapata y Hermelinda Santibáñez Vázquez.

**Educación:** Egresado en 2010 de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Tamaulipas. Egresado en 2013 como Maestro en Ciencias con orientación en Farmacia, en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.